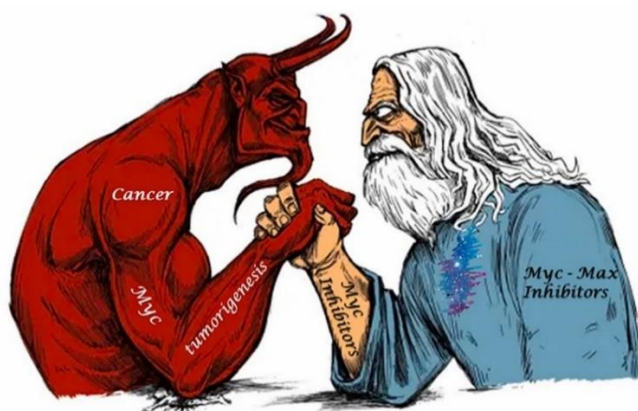




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«Ιατρική Χημεία»



**“In vitro αξιολόγηση πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων  
που στοχεύουν το ετεροδιμερές Myc-Max”**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Διατριβή  
Καραγκιόζης Διονύσιος  
Χημικός**

**Επιβλέπουσα: Πολίτου Αναστασία, Ομότιμη Καθηγήτρια  
Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων**

**Ιωάννινα 2024**

*“Στο πατέρα μου που υπεραγαπώ αλλά έχασα νωρίς και στη μάνα μου που στέκεται βράχος στις πιο σκοτεινές στιγμές μου”*

### Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κύρια Αναστασία Πολίτου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική της καθοδήγηση, τις υποδείξεις, την επιμονή της και τη συνεχή υποστήριξη σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής.

Επίσης, ευχαριστώ τους διδάκτορες Κατερίνα Σουψανά και Άκη Λιοκάτη για τη πολύτιμη βοήθεια τους στην εκμάθηση των πρωτοκόλλων και των τεχνικών του εργαστηρίου αλλά και τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις σχετικά με κάθε ζήτημα που δημιουργούνταν στο πλαίσιο των πειραμάτων.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον μεταπτυχιακό φοιτητή Κωνσταντίνο Τσομακιάν και την υποψήφια διδάκτορα Εύα Τριαντοπούλου για τη συνεχή υποστήριξη και τη βοήθειά τους, καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή.....	8
1.1 Καρκίνος και IDPs.....	9
1.2 Δομική οργάνωση του γονιδίου και ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης του.....	11
1.2.1 Δομική οργάνωση των πρωτεϊνών Myc.....	12
1.2.2 Οι αλληλεπιδράσεις των Myc-box και της C-τερματικής περιοχής συμβάλλουν στη ενδοκυτταρική ρύθμιση και καθορίζουν τους λειτουργικούς ρόλους της πρωτεΐνης.....	14
1.3 Η ενδοκυτταρική ρύθμιση Myc είναι αποτέλεσμα αλληλεπικαλυπτόμενων κόμβων θετικής και αρνητικής ανάδρασης.....	15
1.4 Proximal MYC Network (PMN).....	19
1.5 Δομικές πτυχές των αλληλεπιδράσεων Myc-Myc, Max-Max και Myc-Max .....	20
1.6 Απορρύθμιση Myc και καρκινογένεση.....	23
1.7 Στρατηγικές στόχευσης της MYC.....	24
1.7.1 Έμμεση στόχευση της πρωτεΐνης Myc.....	25
1.7.1.1 Αναστολή της μεταγραφής Myc.....	25
1.7.1.1.2 Στόχευση δομών G4.....	25
1.7.1.1.2 Στόχευση πρωτεϊνών BET.....	26
1.7.1.2 Στόχευση μετάφρασης mRNA του MYC.....	27
1.7.1.2.1 Στόχευση της πρωτεΐνης mTOR.....	27
1.7.1.2.2 Στόχευση των πρωτεϊνών 4E-BP και eIF4A.....	28
1.7.1.2.3 Στόχευση των Myc-mRNAs με ASOs και siRNAs.....	28
1.8 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του ετεροδιμερούς Myc-Max και του συμπλέγματος Myc-Max-DNA .....	29
1.8.1 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του συμπλέγματος Myc-Max-DNA.....	29
1.8.2 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του ετεροδιμερούς Myc-Max.....	31
1.9 Παρεμβολή στον ετεροδιμερισμό Myc-Max μέσω mini-πρωτεϊνών : Η περίπτωση του OMOMYC.....	36
1.10 Ενώσεις που θα αξιολογηθούν στο πλαίσιο της διπλωματικής.....	39
1.11 Βιοφυσικές τεχνικές χαρακτηρισμού της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-φαρμάκου.....	40
1.11.1 Φθορισμομετρία.....	40
1.11.2 Θερμοφόρηση μικροκλίμακας.....	40

1.11.3 Κυκλικός Διχρωισμός (CD).....	42
1.12 Σκοπός.....	44
Κεφάλαιο 2 : Υλικά και Μέθοδοι.....	45
2.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	46
2.2 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	47
2.3 Βιοφυσικές τεχνικές.....	48
2.3.1 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας (Microscale Thermophoresis, MST).....	48
2.3.1.1 Protein Labeling.....	48
2.3.1.2 Binding test.....	48
2.3.2 Απόσβεση Φθορισμού.....	49
2.3.3 Κυκλικός Διχρωισμός.....	50
Κεφάλαιο 3 : Αποτελέσματα.....	51
3.1 Απόσβεση Φθορισμού για τα ανάλογα του Amy22.....	52
3.2 Κυκλικός Διχρωισμός για τα ανάλογα του Amy22.....	55
3.3 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας για τα ανάλογα του Amy22.....	58
3.4 Απόσβεση Φθορισμού για τα ανάλογα του Mysc19.....	60
3.5 Κυκλικός Διχρωισμός για τα ανάλογα του Mysc19.....	62
3.6 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας για τα ανάλογα του Mysc19.....	64
Κεφάλαιο 4 : Συζήτηση .....	66
Βιβλιογραφία.....	74

## Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας στη σημερινή εποχή και σύμφωνα με εκτιμήσεις αναμένεται αύξηση του επιπολασμού στην επόμενη εικοσαετία. Παρότι έχουν γίνει μεγάλα βήματα προόδου στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου και έχει αυξηθεί σημαντικά ο χρόνος επιβίωσης των ασθενών, πολλές περιπτώσεις επιθετικών κακοηθειών δεν είναι ιάσιμες και οι όποιες θεραπείες είναι απλώς παρηγορητικές. Η πολυδιάστατη φύση της ασθένειας καθιστά δύσκολη την εύρεση βιολογικών στόχων που μπορούν να μειώσουν τον ογκογόνο μετασχηματισμό. Ωστόσο, η πολύχρονη βασική έρευνα της βιολογίας του καρκίνου οδήγησε στη ταυτοποίηση μορίων που η αναστολή τους θα μπορούσε να ανακόψει την ογκογένεση. Μια από τις πρωτεΐνες που ξεχωρίζουν για το κεντρικό τους ρόλο στην προώθηση της νόσου αποτελεί η Myc. Η Myc είναι δέκτης πολυάριθμων κυτταρικών οδών και μέσω ετεροδιμερισμού με τη πρωτεΐνη Max ενεργοποιεί περίπου το 15% του γονιδιώματος. Αν και η ενδοκυτταρική της ρύθμιση είναι αυστηρή και πολυεπίπεδη, σε περιπτώσεις δυσλειτουργίας αυτών των μηχανισμών η σταθερότητα και η ποσότητα της πρωτεΐνης αυξάνουν, γεγονός που καθοδηγεί τη καρκινογένεση. Μάλιστα, εκτιμάται πως η Myc συμβάλει στην ανάπτυξη του 75% όλων των καρκίνων με αποτέλεσμα να καθίσταται ένας στόχος υψηλής θεραπευτικής αξίας.

Ωστόσο, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι αδόμητη και δεν εμφανίζει θύλακες δέσμευσης στην επιφάνεια της. Η δομική πλαστικότητα της Myc τη κατέστησε «undruggable» στόχο για πολλά χρόνια. Βέβαια, δομικές μελέτες που διαλεύκαναν τη δομή της καθώς και τον ετεροδιμερισμό Myc-Max άνοιξαν τον δρόμο για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών στόχευσης που μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες, τις έμμεσες και τις άμεσες. Η στόχευση της Myc χαρακτηρίζεται ως έμμεση όταν στοχεύεται ένας παράγοντας που ρυθμίζει τη πρωτεΐνη και ως άμεση όταν στοχεύεται το ίδιο το ετεροδιμερές ή το σύμπλοκο ετεροδιμερούς με το DNA. Από τις άμεσες στρατηγικές στόχευσης, η παρούσα διατριβή επικεντρώνεται στη αποδιάταξη του ετεροδιμερούς μέσω μικρών οργανικών μορίων.

Συγκεκριμένα, η διπλωματική διατριβή παρουσιάζει την *in vitro* αξιολόγηση δύο κατηγοριών ενώσεων που έχουν σχεδιαστεί να αλληλεπιδρούν με τη Myc και να διαταράσσουν του ετεροδιμερές Myc-Max. Ο σχεδιασμός της πρώτης κατηγορίας ενώσεων βασίστηκε σε μοριακές προσομοιώσεις, με μόριο οδηγό την ένωση Amy22 που αποτελεί κύριο μεταβολίτη το γνωστού αναστολέα Myc3. Η δεύτερη κατηγορία ενώσεων βασίστηκε σε υπολογισμούς φαρμακοομοιότητας στη χημική αποθήκη NCI, με μόριο οδηγό την ένωση Myc19 που αποτελεί ανάλογο των γνωστών αναστολέων 10058-F4 και 10074-A4. Στην *in vitro* αξιολόγηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τρεις βιοφυσικές τεχνικές, η θερμοφόρηση μικροκλίμακας, ο κυκλικός διχρωισμός και η απόσβεση φθορισμού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκειμένου να εντοπιστούν οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τη Myc και αναστέλλουν πιο αποτελεσματικά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς.

## Abstract

Cancer is one of the most important public health challenges in today's era and according to estimates of increase in prevalence in the next twenty years. Although great strides have been made in the treatment of several types of cancer and the survival time of patients has increased significantly, many cases of aggressive malignancies are not curable, and the corresponding treatments are only palliative. The multidimensional nature of the disease makes it difficult to find biological targets that can reduce oncogenic transformation. However, many years of basic cancer biology research has led to the identification of molecules whose inhibition could halt tumorigenesis. One of the proteins that stand out for their significant role in promoting the disease is Myc. Myc is a receptor of numerous cellular pathways and through heterodimerization with the Max protein acts on approximately 15% of the genome. Although the intracellular regulation is strict and multi-layered, in cases of dysfunction of these mechanisms the stability and quantity of the protein increase, which drives carcinogenesis. In fact, it is estimated that Myc contributes to the development of 75% of all cancers, making it a target of high therapeutic value.

However, this protein is unstructured and does not display binding pockets on its surface. The structural plasticity of Myc has made it an "undruggable" target for many years. Certainly, structural studies that pick out its structure as well as Myc-Max heterodimerization have paved the way for the development of new strategic targets that can be distinguished into two categories, indirect and direct. Targeting of Myc is characterized as indirect when targeting a factor that regulates the protein and as direct when targeting the heterodimer itself or the heterodimer complex with DNA. Of the direct targeting strategies, the present thesis focuses on the disruption of the heterodimer by means of small organic molecules.

Specifically, the thesis presents the *in vitro* evaluation of two classes of compounds designed to interact with Myc and disrupt Myc-Max heterodimers. The design of the first class of compounds was based on molecular simulations, with the lead molecule being the compound Amy22 which is the main metabolite of the known Myc inhibitor. The second class of compounds was based on drug similarity calculations in the NCI chemical repository, with the lead molecule compound Myc19 being an analog of the known inhibitors 10058-F4 and 10074-A4. Three biophysical techniques, microscale thermophoresis, circular dichroism and fluorescence quenching, were used in the *in vitro* evaluation of the compounds. Finally, a comparative analysis of the results was performed in order to identify the compounds that interact most strongly with Myc and most effectively inhibit the formation of the heterodimer.

# **Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή**

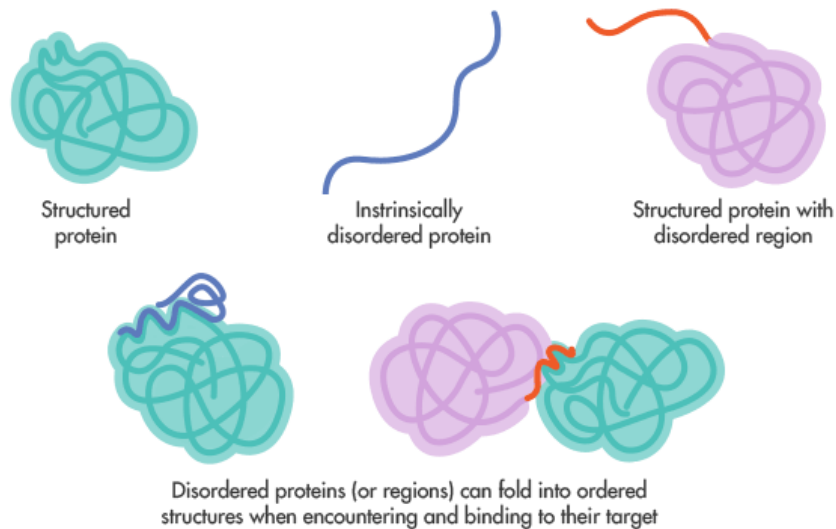


## 1.1 Καρκίνος και IDPs

Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Σύμφωνα, με εκτιμήσεις του Διεθνούς Οργανισμού Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), το έτος 2022 υπήρξαν σχεδόν 20 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου με 9,7 εκατομμύρια από αυτές να καταλήγουν σε θάνατο. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι περίπου ένας στους πέντε άνδρες ή γυναίκες αναπτύσσει καρκίνο στη ζωή του, ενώ περίπου ένας στους εννέα άνδρες και μία στις δώδεκα γυναίκες πεθαίνουν από αυτόν. Μάλιστα, δημογραφικές προβλέψεις δείχνουν ότι ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου θα φτάσει τα 35 εκατομμύρια έως το 2050, γεγονός που καθιστά τη συγκεκριμένη ασθένεια μια από τις πιο σοβαρές προκλήσεις της δημόσιας υγείας (Bray et al., 2024).

Ο καρκίνος αποτελεί μια γενετική ασθένεια, δηλαδή προκαλείται από αλλαγές σε γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων και κυρίως τον τρόπο με τον οποίο αναπτύσσονται και διαιρούνται. Η μετάπτωση των κυττάρων από μια φυσιολογική σε μια νεοπλασματική κατάσταση και εν συνεχεία σε κακοήθεια αποτελεί μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων και προοδευτικής εμφάνισης συγκεκριμένων χαρακτηριστικών που καθοδηγούν τη καρκινογένεση. Συγκεκριμένα, η γενωμική αστάθεια, ο ανεξέλεγκτος και συνεχής πολλαπλασιασμός, η μη απόκριση σε ανασταλτικά μηνύματα ανάπτυξης, η διαφυγή του κυτταρικού θανάτου, ο μεταβολικός επαναπρογραμματισμός, η ανοσοδιαφυγή, η αγγειογένεση και εν τέλη η μετάσταση αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά της εξέλιξης του καρκίνου (Hanahan & Weinberg, 2011).

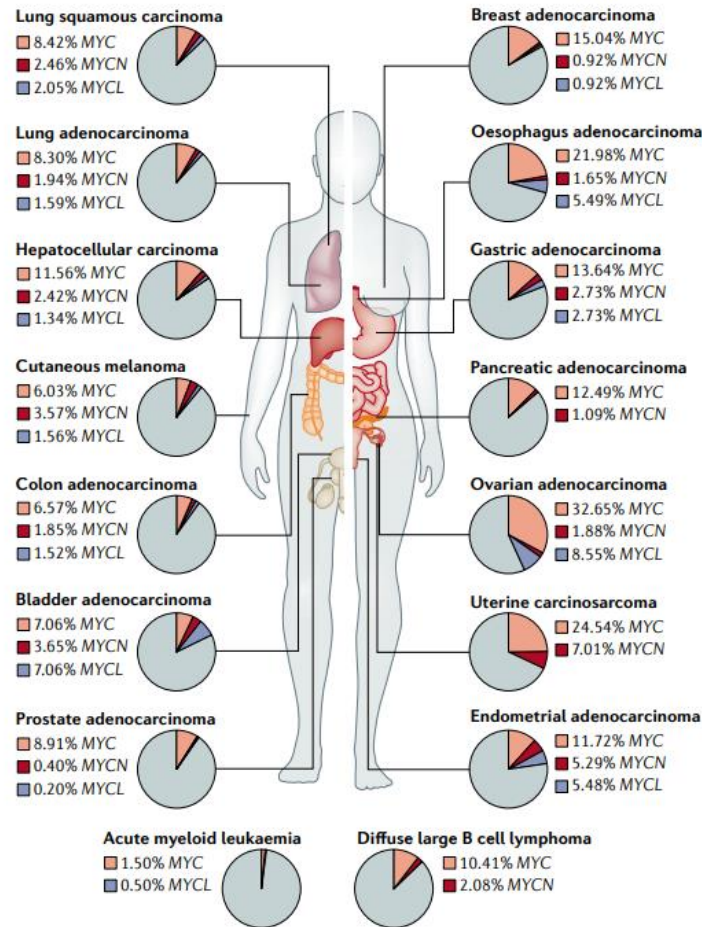
Τα παραπάνω ογκογόνα χαρακτηριστικά προκύπτουν από τη συσσώρευση μεταλλάξεων που έχουν σαν αποτέλεσμα είτε τη μεταβολή πρώτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια είτε την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Για πολλά χρόνια λοιπόν, η έρευνα πιθανών φαρμακολογικών στόχων κατά του καρκίνου στηρίχθηκε στη μελέτη πρωτεϊνών που αποτελούν ανάντη ρυθμιστές των γονιδίων αυτών όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στο κύτταρο και επιτελούν τη μεταβίβαση εξωκυτταρικών μηνυμάτων σε κατάλληλες πρωτεΐνες-στόχους μέσω φωσφορυλίωσης. Η έρευνα των πρωτεϊνικών κινασών έχει αποδώσει και αποδίδει πολλές φαρμακευτικές ενώσεις που δρουν ως αναστολείς βοηθώντας στην αντιμετώπιση και το περιορισμό διαφόρων τύπων καρκίνου (Fabbro, 2015). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια ένα νέο πεδίο βιοϊατρικής έρευνας εστιάζει στην εύρεση αναστολέων εγγενώς αδόμητων πρωτεϊνών (IDPs / intrinsically disordered protein). Σε σύγκριση με τις περισσότερες πρωτεΐνες του κυττάρου (όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες) που διαθέτουν μια σταθερή τρισδιάστατη διαμόρφωση, οι IDPs έχουν υψηλό βαθμό διαμορφωτικής ευελιξίας υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η έλλειψη σταθερής διαμόρφωσης μπορεί να χαρακτηρίζει ολόκληρη τη πρωτεΐνη (c-Myc) ή μόνο συγκεκριμένες περιοχές της (IDRs / intrinsically disordered regions) (**Εικόνα 1**). Η απουσία τρισδιάστατης δομής σε αυτές τις πρωτεΐνες προάγει τη δομική ευελιξία και την πλαστικότητα, οι οποίες συνδέονται με κύριους λειτουργικούς ρόλους όπως η απόκριση σε πληθώρα σηματοδοτικών οδών, η μεταγραφική ρύθμιση και η επαγωγή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που συμβάλουν στη ρύθμιση της λειτουργίας διαφόρων πρωτεϊνών-στόχων. Οι πολλαπλοί ρόλοι των IDPs επεκτείνουν τις λειτουργίες του συνολικού πρωτεϊνικού δικτύου ενός κυττάρου, δίχως να αυξάνουν το μέγεθος του, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την πολυπλοκότητα του οργανισμού (στους ευκαριωτικούς οργανισμούς εκτιμάται πως το 52%- 67% των πρωτεϊνών περιέχουν τουλάχιστον μια IDR) (Alshehri et al., 2020; Trivedi & Nagarajaram, 2022).



**Εικόνα 1:** Σχηματικές αναπαραστάσεις πρωτεϊνών που έχουν σταθερή τρισδιάστατη διαμόρφωση, είναι εγγενώς αδόμητες, διαθέτουν αδόμητη περιοχή. Οι εγγενώς αδόμητες πρωτεΐνες μπορούν να αποκτήσουν παροδικά, σταθερή διαμόρφωση, συνδεόμενες με τον στόχο τους.

Παρόλο που η ενδοκυτταρική ρύθμιση τέτοιων πρωτεϊνών είναι αυστηρή και πολυεπίπεδη, συχνά σε πολλούς τύπους καρκίνου η απορρύθμιση τους έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση ιδιαίτερα επιθετικής νόσου. Η σύγχρονη έρευνα λοιπόν, εστιάζει στην εύρεση κατάλληλων μορίων που δυνητικά θα μπορούσαν να αναστείλουν τη δράση τέτοιων πρωτεϊνών, συμβάλλοντας στη μείωση του ογκογόνου μετασχηματισμού.

Ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας αυτής, αφορά τη μελέτη του Myc, ενός σημαντικού ογκογονιδίου που εκτιμάται ότι συμβάλλει στο 75% τουλάχιστον όλων των καρκίνων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου, των λεμφωμάτων, των μικροκυτταρικών καρκινωμάτων του πνεύμονα και το νευροβλάστωμα, οι περισσότεροι εκ των οποίων είναι επιθετικοί και ανταποκρίνονται ελάχιστα στις τρέχουσες θεραπείες (**Εικόνα 2**). Ο Myc είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που λειτουργεί ως κεντρικός κατάντη τελεστής μέσα στον πυρήνα, αφού δέχεται σήματα από πολυάριθμες ανοδικές οδούς για να κατευθύνει τη γονιδιακή έκφραση και να ρυθμίσει πολλές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της προώθησης της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, του μεταβολισμού και του μετασχηματισμού ενώ εμποδίζει τη διαφοροποίηση. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας βρίσκεται υπό εξαιρετικά αυστηρό έλεγχο στο κύτταρο, αλλά ελαττώματα στη ρύθμισή του οδηγούν σε υπερβολική αφθονία ή αυξημένη σταθερότητα που είναι χαρακτηριστικά πολλών τύπων καρκίνου (Carabet et al., 2018).



**Εικόνα 2:** Το *c-Myc* και τα παράλογα του *N-* και *L-Myc* συμμετέχουν με διαφορετικά ποσοστά στη δημιουργία 16 συχνών τύπων ανθρώπινου καρκίνου του Άτλαντα του γονιδιώματος του καρκίνου.

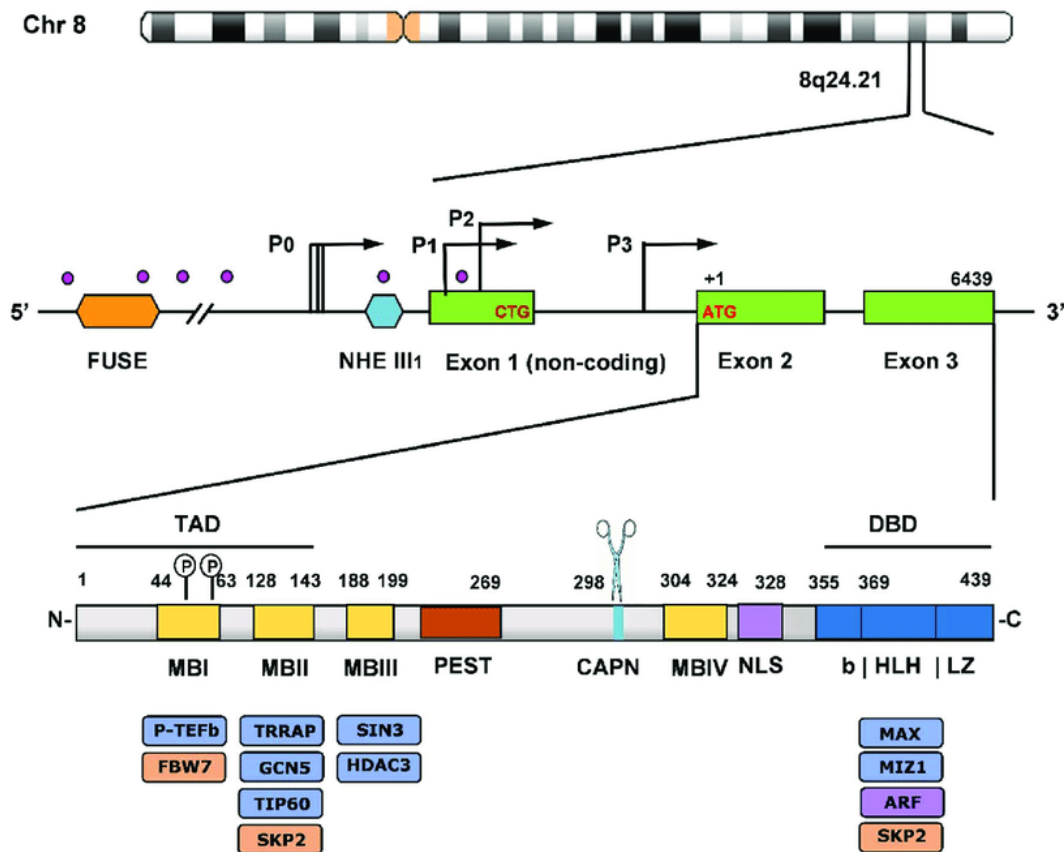
### 1.2 Δομική οργάνωση του γονιδίου και ρυθμιστικά στοιχεία της έκφρασης του

Το ανθρώπινο γονίδιο *Myc* έχει μήκος περίπου 6 kbp, εδράζεται στο χρωμόσωμα 8, διαθέτει τρία εξόνια εκ των οποίων τα 2 και 3 κωδικοποιούνται ενώ το 1 όχι, τέσσερις προαγωγείς και δύο κωδικόνια έναρξης μετάφρασης. Οι προαγωγείς P1 και P2 είναι οι δύο κύριες θέσεις έναρξης μεταγραφής που βρίσκονται στο 5' άκρο του εξονίου 1, με περισσότερα από τα τρία τέταρτα των μεταγραφών *MYC* να προέρχονται από τον προαγωγέα P2.

Περισσότεροι από 30 μεταγραφικοί παράγοντες (όπως E2F, SP1, β-κατενίνη/TCF-4, Smad3, NF-κB, STAT3, ER και AR) συνδέονται με τον προαγωγέα *MYC* σε διακριτές *cis* - ρυθμιστικές αλληλουχίες, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή του ως απόκριση σε διάφορα πολλαπλασιαστικά και αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα. Δύο σημαντικά *cis*-στοιχεία που βρίσκονται ανάντη των προαγωγέων P1 και P2 - το μακρινό ανοδικό στοιχείο αλληλουχίας (FUSE) και το στοιχείο υπερευαισθησίας νουκλεάσης III 1 (NHEIII 1) - μπορούν να σχηματίσουν μη κανονικές δομές DNA (όπως τα κατασταλτικά G-quadruplex) και συνακόλουθα να ελέγξουν τη μεταγραφή του *MYC* (Εικόνα 3). Επιπλέον, η μεταγραφή *MYC* ρυθμίζεται εκτενώς μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, της ακετυλίωσης των ιστονών καθώς και από την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA.

Η πρωτεΐνη *Myc* επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα το δικό της επίπεδο έκφρασης. Η άμεση ρύθμιση περιλαμβάνει έναν βρόχο αρνητικής ανάδρασης όπου η *Myc* καταστέλλει τον κύριο προαγωγέα

της P2 δεσμεύοντας τον υποκινητή του γονιδίου της. Η άμεση καταστολή της Myc απαιτεί τον ετεροδιμερισμό Myc-Max, αλλά δεν συμβαίνει μέσω δέσμευσης E-box, αλλά μέσω δέσμευσης στο στοιχείο Inr (εκκινητής) και διαμεσολαβείται από τους παράγοντες μεταγραφής Inr-binding και E2F. Έμμεσα, η Myc δρα τόσο ως ενεργοποιητής όσο και ως καταστολέας των δικών της ενεργοποιητών και καταστολέων (Carabet et al., 2018).

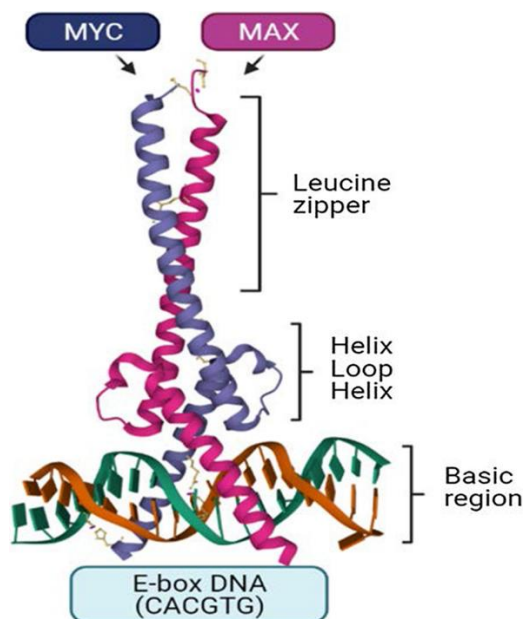


**Εικόνα 3:** Η παραπάνω εικόνα δείχνει τον τρόπο οργάνωσης του γονιδίου Myc αλλά και τις πρωτεΐνες που κωδικοποιείται. Η πρωτεΐνη Myc οργανώνεται σε πολλαπλούς τομείς καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από διακριτές λειτουργίες. Αυτό καταδεικνύεται από τον μεγάλο αριθμό παραγόντων που αλληλεπιδρούν με κάθε υποπεριοχή της συνολικής πρωτεϊνικής δομής (Carabet et al., 2018).

### 1.2.1 Δομική οργάνωση των πρωτεϊνών Myc

Η οικογένεια Myc στο ανθρώπινο γονιδίωμα διαθέτει τρία μέλη, το c-myc ( MYC ), το l-myc ( MYC-L ) και το n-myc ( MYC-N ). Το c-Myc είναι το κύριο γονίδιο της οικογένειας που παρουσιάζει συστηματική έκφραση και ευθύνεται για τους περισσότερους τύπους καρκίνου, το n-Myc ενισχύεται κυρίως σε περιπτώσεις νευροβλαστώματος ενώ το l-Myc παρουσιάζει αυξημένη έκφραση σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ανεξαρτήτως του γονιδίου που εκφράζεται, όλες οι πρωτεΐνες Myc διαθέτουν έναν N-τερματικό τομέα μετενεργοποίησης (TAD) που σε μεγάλο βαθμό είναι αδόμητος (περιέχει 143 αμινοξέα) και εμπλέκεται σε διεργασίες μετασχηματισμού και μεταγραφής που ασκούνται από την εκάστοτε πρωτεΐνη. Ο τομέας αυτός περιέχει διατηρημένες λειτουργικές μονάδες, που ονομάζονται Myc boxes (MBI, MBII). Το MBI περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης που εμπλέκονται στην πρωτεασωματική αποδόμηση της Myc ενώ το MBII εμπλέκεται στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων

στόχων. Οι πρωτεΐνες Myc περιέχουν επίσης ένα κεντρικό τμήμα πλούσιο σε υπολείμματα προλίνης, γλουταμινικού οξέος, σερίνης και θρεονίνης (PEST), το οποίο είναι απαραίτητο για την ταχεία αποικοδόμηση τους μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού από την ουβικιτινίωση. Το MBIII απαιτείται για τη μεταγραφική καταστολή και το MBIV είναι σημαντικό για τη μεταγραφική δραστηριότητα και την αποπτωτική δράση της Myc. Στη συνολική δομή της πρωτεΐνης περιέχεται μια θέση διάσπασης καλπαΐνης (CAPN) που εμπλέκεται στη μερική διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου του κυτοσολικού Myc, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του "Myc-nick", ένα αμινοτελικό τμήμα 298 αμινοξέων που απενεργοποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα Myc. Επιπλέον, περιέχεται μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) για την εισαγωγή της πρωτεΐνης στον πυρήνα. Το C-άκρο των πρωτεϊνών Myc, μήκους ~ 100 αμινοξέων, περιλαμβάνει την περιοχή διμερισμού έλικας-βρόχου-έλικας, φερμουάρ λευκίνης (bHLHLZ). Το μοτίβο bHLHLZ καθορίζει τον διμερισμό μέσω της περιοχής έλικας-βρόχου-έλικας-φερμουάρ λευκίνης (HLHZ) και την αναγνώριση του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της βασικής περιοχής (b) και της κύριας αύλακας. Η Myc δεν μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή in vivo και δεν συνδέεται στο DNA ως μονομερές. Ο υποχρεωτικός εταίρος δέσμησης της Myc είναι η Max. Οι πρωτεΐνες Myc και Max διμερίζονται και αποκτούν μια σταθερή ελικοειδή διαμόρφωση που σχηματίζει μια λειτουργική περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD). Μέσω της DBD, οι Myc και Max δεσμεύουν μαζί ειδικές αλληλουχίες αναγνώρισης DNA 5'-CACGTG-3', που ονομάζονται E-boxes σε γονίδια-στόχους (**Εικόνα 4**). Η δέσμευση των E-Box από το ετεροδιμερές ενεργοποιεί τη στρατολόγηση συμπλεγμάτων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και τη συναρμολόγηση του μεταγραφικού μηχανισμού. Με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται περισσότερο από το 15% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Carabet et al., 2018).



**Εικόνα 4:** Κρυσταλλική διαμόρφωση του ετεροδιμερούς Myc-Max. Όπως παρουσιάζεται και στη παραπάνω εικόνα, το ετεροδιμερές χαρακτηρίζεται από τις διακριτές περιοχές: τις περιοχές LZ και HLH που σταθεροποιούν την ετεροδιμερική διαμόρφωση και ενισχύουν εν μέρη τη σύνδεση του στο DNA και την βασική περιοχή που αποτελεί τη κύρια περιοχή αλληλεπίδρασης με το DNA, μέσω της δέσμησης E-box σε γονίδια στόχους (Ahmadi et al., 2021).

### 1.2.2 Οι αλληλεπιδράσεις των Myc-box και της C-τερματικής περιοχής συμβάλλουν στη ενδοκυτταρική ρύθμιση και καθορίζουν τους λειτουργικούς ρόλους της πρωτεΐνης

Η υποκυτταρική κατανομή, η σταθερότητα και η αποικοδόμηση της c-Myc αλλά και των παραλόγων της L-Myc και N-Myc ρυθμίζονται με ακρίβεια μέσω πολλαπλών μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, συντονισμένης αλληλεπίδρασης με έναν τεράστιο αριθμό συμπαραγόντων και του Proximal MYC Network (PMN).

Το συντηρημένο MBI της Myc-TAD περιέχει δύο θέσεις φωσφορυλίωσης τη Thr58 και τη Ser62 οι οποίες διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε όλες τις ισομορφές MYC των θηλαστικών και εμπλέκονται στον έλεγχο της σταθερότητας τους και της πρωτεασωμικής τους αποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, η σταθεροποίηση της Myc εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της Ser62 ενώ η αποικοδόμηση της επάγεται από τη φωσφορυλίωση της Thr58. Η ρύθμιση της Myc μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των καταλοίπων Thr58 και Ser62, θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.

Η περιοχή MBII του TAD, είναι σημαντική για τις περισσότερες δραστηριότητες Myc λειτουργώντας ως τύπος σύνδεσης πολλαπλών πρωτεϊνικών παραγόντων. Ένας από τους βασικούς παράγοντες που στρατολογούνται από το ετεροδιμερές Myc-Max μέσω της MBII για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης είναι ο TRRAP. Ο TRRAP χρησιμεύει ως ικρίωμα για τη συναρμολόγηση ενός πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος στις θέσεις δέσμευσης του ετεροδιμερούς Myc/Max στο γονιδίωμα (McMahon et al., 1998). Ο TRRAP στρατολογεί σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, που περιέχουν ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HAT), όπως η GCN5, η Tip60 και η Tip48 προωθώντας την γονιδιακή ενεργοποίηση. Μάλιστα, η ογκογόνος δράση της c-Myc σχετίζεται τόσο άμεσα με την ενεργότητα του παράγοντα TRRAP, ώστε μεταλλάξεις που έχουν αρνητική επίδραση σε αυτή να μειώνουν και άμεσα τον ογκογόνο μετασχηματισμό (Carabet et al., 2018; Conacci-Sorrell et al., 2014).

Μια άλλη πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το MBII της MYC είναι η Skp2. Συγκεκριμένα, η Skp2 αλληλεπιδρά με δύο περιοχές της MYC, το μοτίβο βασικής έλικας-βρόχου-έλικας-φερμουάρ λευκίνης (bHLHZ) (αμινοξέα 379-418) και το MBII (αμινοξέα 129-147). Κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 σε S, η συγκεκριμένη λιγάση διεγείρει την υποβάθμιση της MYC ωστόσο σε αντίθεση με τη Fbw7 (αναλύεται παρακάτω), η ουβικιτινίωση είναι ανεξάρτητη της φωσφορυλίωσης. Αν και η Skp2 μειώνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης MYC, επάγοντας την αποδόμησή της, επιφέρει το αντίθετο αποτέλεσμα στη μεταγραφική της δραστηριότητα. Η Skp2 ως συμπαράγοντας προάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα της Myc (Farrell & Sears, 2014; G. Wang et al., 2012). Η σύνδεση μεταξύ μεταγραφικής δραστηριότητας και καταστροφής που επάγεται από την SKP2 είναι ένα παράδειγμα του μοντέλου μεταγραφής «Kamikaze». Σύμφωνα με αυτό, η καταστροφή του μεταγραφικού παράγοντα αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της δραστηριότητάς του, αυτό συμβαίνει για τη διατήρηση των «επικίνδυνων» πρωτεϊνών όπως η Myc υπό αυστηρό και έγκαιρο κυτταρικό έλεγχο (Hydbring et al., 2017).

Το MBIII διαθέτει ειδικές θέσεις αλληλεπίδρασης με αποακετυλάσες ιστόνης, όπως η HDAC3, επάγοντας τη μεταγραφική καταστολή γονιδίων στόχων της Myc (Kurland & Tansey, 2008). Από την άλλη πλευρά, μέσω του MBIII η Myc αλληλεπιδρά με την WDR5, μια πρωτεΐνη που σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση της με τη χρωματίνη συμβάλλοντας στην επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων στόχων (Thomas et al., 2015). Επιπλέον, μέσω του MBIV η Myc αλληλεπιδρά με τον p27, έναν από τους φύλακες της μετάβασης G1-S του κυτταρικού κύκλου. Ο p27 μειώνει τα επίπεδα Myc, μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση στη Ser62, υποβαθμίζοντας ταυτόχρονα τη δραστηριότητά της. Από την άλλη πλευρά, ο p27 είναι ένας από τους βασικούς στόχους της SKP2 που πυροδοτεί την ουβικουιτιλίωση και την



αποικοδόμησή του, οδηγώντας σε μεταγραφική ενεργοποίηση που εξαρτάται από Myc (Hydbring et al., 2017).

Μέσω των περιοχών MBII-MBIII και MBIV η Myc αλληλεπιδρά με τις ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης p300/CBP. Συγκεκριμένα, έχουν αναγνωριστεί 5 υπολείμματα λυσίνης (K144, K149, K158, K317 και K323) που βρίσκονται στις παραπάνω περιοχές της Myc και αποτελούν άμεσοι στόχοι ακετυλίωσης των p300/CBP σε κύτταρα θηλαστικών. Η ακετυλίωση ενός ή περισσότερων από τα παραπάνω κατάλοιπα λυσίνης από τις p300/CBP αποσταθεροποιεί τη Myc συμβάλλοντας στη μείωση των επιπέδων της (Faiola et al., 2005). Αντίθετα, η αλληλεπίδραση των p300/CBP με τον τομέα TAD διεγείρει την εξαρτώμενη από Myc μεταγραφή σε προαγωγείς γονιδίων στόχων όπως το hTERT. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλει στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων Myc στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου και υποβοηθά την εξέλιξη του μέσω ελεγχόμενης αύξησης των επιπέδων Myc καθώς το κύτταρο εισέρχεται στη φάση S (Rajabi et al., 2005). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως ο διττός ρόλος των p300/CBP στη ρύθμιση της Myc, φαίνεται εντυπωσιακά παρόμοιος με τον ρόλο της Skp2 στην αποικοδόμηση της Myc με την ταυτόχρονη αύξηση της μεταγραφής της γεγονός που καταδεικνύει για ακόμη μια φορά τη πολυπλοκότητα στη ρύθμιση του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα (Faiola et al., 2005).

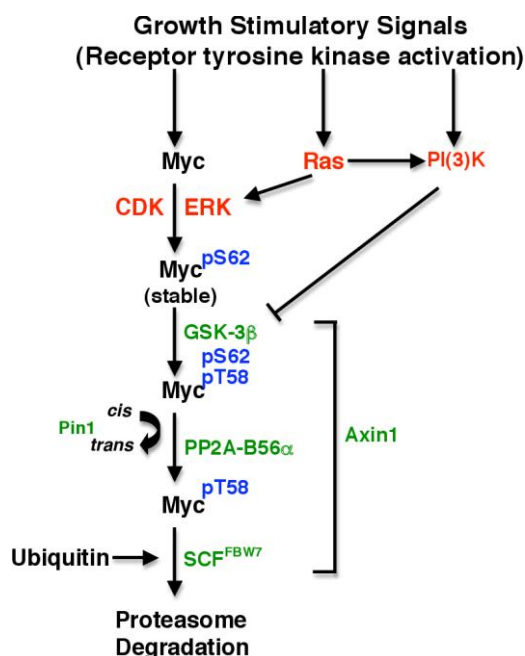
Τέλος, η C-τερματική περιοχή της πρωτεΐνης Myc είναι αυτή που μέσω της αλληλεπίδρασης με τη Max επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων, όπως θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια. Πέραν, όμως της Max με το C-άκρο της Myc αλληλεπιδρούν και παράγοντες όπως ο MIZ-1 ή ο SP1 που την μετατρέπουν από μεταγραφικό ενεργοποιητή σε καταστολέα. (Carabet et al., 2018) Πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου καταστέλλονται με αυτό τον τρόπο. Αλλά μόρια που αλληλεπιδρούν με το C-άκρο είναι η Skp2 όπως έχει ήδη αναφερθεί αλλά και ο ARF, ένας παράγοντας που μέσω της αλληλεπίδρασης του με τη Myc αναστέλλει τη διαμεσολαβούμενη από Skp2 ουβικουιλίωση του Myc-TAD. Η απώλεια ουβικουιλίωσης του TAD από την Skp2 μεταβάλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα της Myc ρυθμίζοντας προς τα πάνω ένα μη κανονικό γονίδιο-στόχο που ονομάζεται Egr1. Η εξαρτώμενη από Myc αύξηση της έκφρασης του Egr1 επάγει την απόπτωση που είναι ανεξάρτητη του p53 (Zhang et al., 2013). Συνολικά, λοιπόν οι αλληλεπιδράσεις MYC - MIZ-1, Myc-SP1, Myc-ARF αλλά και η προσβασιμότητα στη χρωματίνη που επηρεάζεται από επιγενετικές τροποποιήσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ειδική καταστολή γονιδίων, ορίζοντας ένα πιο εκλεκτικό μοντέλο ενίσχυσης.

### **1.3 Η ενδοκυτταρική ρύθμιση Myc είναι αποτέλεσμα αλληλεπικαλυπτόμενων κόμβων θετικής και αρνητικής ανάδρασης**

Τη σταθερότητα της Myc φαίνεται να επηρεάζουν η κινάση εξωκυτταρικού υποδοχέα (ERK) και η εξαρτώμενη από κυκλίνη πρωτεϊνική κινάση 2 (CDK2) ενώ η αποσταθεροποίηση της Myc καταλύεται κυρίως από την κινάση συνθάσης γλυκογόνου (GSK-3β) μέσω της φωσφορυλίωσης της Thr58 που είναι ένα πρώτο βήμα ενεργοποίησης της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης. Ο χρόνος ημιζωής της Myc στον πυρήνα, όπως διαμορφώνεται από την εξισορρόπηση μεταξύ σταθεροποιητικών και αποσταθεροποιητικών σημάτων είναι περίπου μισή ώρα. (Ahmadi et al., 2021).

Δύο βασικές σηματοδοτικές οδοί που αυξάνουν σημαντικά τον χρόνο ημιζωής της MYC μέσω αρνητικής ανάδρασης είναι η οδός Raf\MEK\ERK και η οδός σηματοδότησης PI3K \Akt. Συγκεκριμένα, η μιτογόνο διεγερση ενεργοποιεί τη πρωτεΐνη Ras που οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας της Myc μέσω της φωσφορυλίωσης της Ser-62 που προκαλείται από την ERK ενώ παράλληλα επάγει την ενεργοποίηση του καταρράκτη PI3K\Akt που αποτρέπει την

φωσφορυλίωση της Thr-58 μέσω της καταστολής της GSK-3β. Τα παραπάνω γεγονότα οδηγούν στη σταθεροποίηση της Myc και στην αύξηση των ενδοκυτταρικών της επιπέδων. (Ahmadi et al., 2021) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της οδού αποικοδόμησης c-Myc (T58/S62) (Sears, 2004).

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης Myc είναι ο BRD4 (Bromodomain 4). Ο BRD4 είναι ένας επιγενετικός και μεταγραφικός ρυθμιστής με εγγενείς δραστηριότητες ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (HAT) στις καρβοξυτελικές του περιοχές και κινάσης στις αμινοτελικές. Δρώντας ως κινάση ο BRD4 αλληλεπιδρά άμεσα με τη Myc φωσφορυλιώνοντας τη Thr-58, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της. (Devaiah et al., 2020; Kotekar et al., 2023). Παράλληλα, ο BRD4 δρώντας ως επιγενετικός ρυθμιστής αφενός συνδέεται σε υπερ-ακετυλιωμένες ιστονικές περιοχές κατά μήκος της χρωματίνης και στρατολογεί μεταγραφικούς ενεργοποιητές (P-TEFb), αφετέρου εξωθεί νουκλεοσώματα γύρω από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων, διεγείροντας τη μεταγραφή. (Devaiah et al., 2012, 2016). Αξίζει επίσης να σημειωθεί, πως η MYC φωσφορυλιωμένη είτε από την ERK1 είτε από τον BRD4 δεν είναι σε θέση να αναστείλει τη δραστηριότητα HAT του BRD4, ενώ η δέσμευση του BRD4 στη χρωματίνη ή η φωσφορυλίωση του από την ERK1 αναστέλλει τη δράση κινάσης με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της Myc. (Εικόνα 6). Η αλληλένδετη ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών υποδεικνύει ένα σύνθετο ρυθμιστικό δίκτυο ελέγχου των επιπέδων MYC για την εξασφάλιση της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργίας (Devaiah et al., 2020).

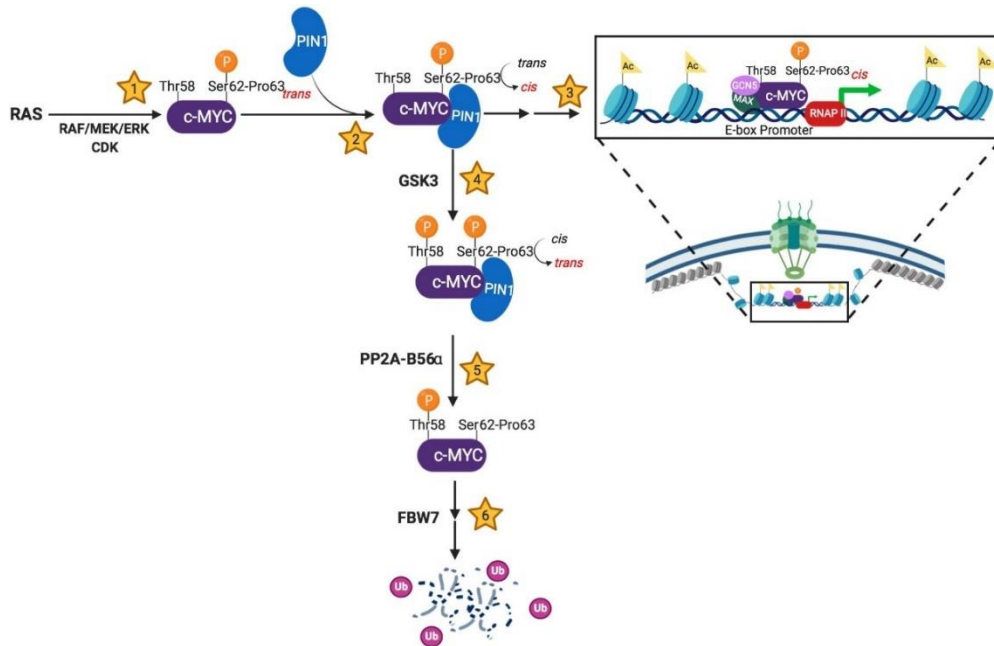




**Εικόνα 6:** Η BRD4 φωσφορυλιώνει απευθείας τη Myc στη T58 μέσω της δραστηριότητας κινάσης, επάγοντας έτσι την αποδόμησή της. Η αλληλεπίδραση Myc - BRD4 με την ERK1 επάγει το σχηματισμό ενός τριμερούς συμπλόκου που αποτρέπει την αποσταθεροποίηση της Myc από την BRD4. Επιπλέον, η BRD4 προάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση της MYC αποσυμπυκνώνοντας τη χρωματίνη γύρω από το γονίδιο της, μέσω της δραστηριότητας της ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (Boi et al., 2023).

Στη ρύθμιση των επιπέδων Myc συμβάλλει επίσης η ειδική για το υπόστρωμα φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A). Η PP2A αποφωσφορυλιώνει το υπολείμμα Ser-62 επάγοντας την πρωτεασωμική αποδόμηση Myc που προκαλείται από ουβικιτίνη. (Ahmadi et al., 2021).

Η προλυλ-ισομεράση Pin1 συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της Myc μέσω αναγώρισης και ισομερισμού του μοτίβου pThr58-pSer62-Pro63. Συγκεκριμένα, η Myc που φέρει διπλή φωσφορυλίωση στα υπολείμματα 58 και 62 αναγνωρίζεται από την Pin-1 η οποία μεταβάλλει τη Pro-63 της Myc από cis σε trans διαμόρφωση. Αυτή η διαμορφωτική μεταβολή καθιστά το MBI ιδανικό υπόστρωμα για την αφαίρεση του σταθεροποιητικού υπολείμματος Ser-62 από την PP2A-B56a και την επαγωγή πρωτεασωμικής αποικοδόμησης μέσω της FBW7. Από την άλλη πλευρά η Pin1 μπορεί να συμβάλλει στη προστασία της pSer-62 μέσω της αλλαγής της διαμορφωτικής κατάστασης της pro-63 σε cis θέση. Η τοποθέτηση της pro-63 σε cis-θέση ως προς την pSer-62 προστατεύει την αποφωσφορυλίωση από την PPA2 και συνακόλουθα διευκολύνει την δέσμευση της c-Myc στους προαγωγείς γονιδίων στόχων. (Εικόνα 5 & 7) (Campaner et al., 2017; Farrell et al., 2013; Helander et al., 2015)



**Εικόνα 7:** Το παραπάνω σχήμα δείχνει τη συμμετοχή της PIN1 στα μοριακά συμβάντα που ρυθμίζουν τη σταθερότητα της MYC. (1) Η c-MYC γίνεται μεταγραφικά ενεργή μετά από τη φωσφορυλίωση της Ser62 από trans-ειδικές κινάσες που ενεργοποιούνται μέσω RAS ή κυκλινών. (2) Η PIN1 σταθεροποιεί το μοτίβο pSer62-Pro63-MYC στη διαμόρφωση cis, αποτρέποντας την αποφωσφορυλίωση. (3) Το cis-pSer62-Pro63-MYC, εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα, γεγονός που προάγει τον ετεροδιμερισμό με τη Max, τη δέσμευση E-box και την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. (4) Η c-MYC κατευθύνεται προς αποικοδόμηση μέσω φωσφορυλίωσης της Thr58 από την κινάση GSK-3β. Η φωσφορυλίωση αυτή προάγει την αποφωσφορυλίωση της pSer62, αλλά απαιτεί τη μεταβολή της cis διαμόρφωσης του μοτίβου pSer62-Pro63 σε trans από την Pin1. (5) Η trans-ειδική φωσφατάση, PP2A-B56α, αφαιρεί τη φωσφορική ομάδα από το κατάλοιπο Ser62. (6) Η pThr58-MYC στοχεύεται για πρωτεασωμική αποικοδόμηση μέσω της FBW7 (Cohn et al., 2020).

Ο κύριος μηχανισμός που καταλύει την ανακύκλωση της πρωτεΐνης Myc είναι η αποικοδόμηση που προκαλείται από την ουβικιτίνη μέσω διαφορετικών λιγασών ουβικιτίνης E3. Η MYC πολυ-ουβικιτινυλιώνεται από μια ποικιλία λιγασών ουβικιτίνης E3, όπως η Fbw7, η Skp2, η TRUSS, η HectH9 και η FBXO28. Η Fbw7 είναι η κύρια λιγάση που επάγει την αποικοδόμηση της Myc στον άνθρωπο αναγνωρίζοντας την αλληλουχία που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Thr-58 και Ser-62 του MBI. Έτσι μαζί με τις πρωτεΐνες Pin1 και PP2A-B56α, η Fbw7 συμβάλει στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων MYC. Μετά την αποφωσφορυλίωση της Ser-62, η λιγάση Fbw7 E3 αναγνωρίζει τη pThr-58 και επάγει την αποικοδόμηση της MYC μέσω του πρωτεασώματος 26S. Ωστόσο, το μοτίβο ουβικιτινυλίωσης της Myc είναι πολύ πιο πολύπλοκο καθώς ορισμένες λιγασές E3 (HECTH9, FBXO28, SKP2) φαίνεται να ενισχύουν τη μεταγραφική δράση της MYC, με μη πρωτεολυτικό τρόπο ενώ άλλες όπως οι Fbw7 και TRUSS υποβαθμίζουν τα επίπεδα Myc δρώντας πρωτεολυτικά. (Ahmadi et al., 2021; Hydbring et al., 2017).

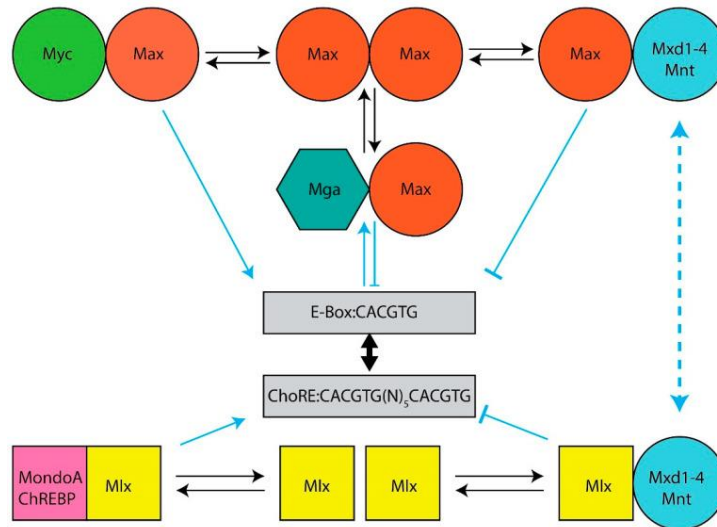
#### 1.4 Proximal MYC Network (PMN)

Η πρωτεΐνη Myc αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου πρωτεϊνικού δικτύου μέσω των οποίων επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ της ενεργοποίησης και της καταστολής γονιδίων στόχων του ετεροδιμερούς Myc-Max. Το δίκτυο των τριών παραγόντων μεταγραφής Myc-Max-Mlx διαθέτει δύο κύριους κόμβους, ένα με επίκεντρο την πρωτεΐνη Max και ένα με επίκεντρο την Mlx. Στον πρώτο κόμβο η Max εκτός από την Myc συνδέεται με μέλη της οικογένειας Mxd 1-4 (παλαιότερα ονομάζονταν Mad), μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Mnt και τον παράγοντα Mga.

Τα μέλη της οικογένειας Mxd ανταγωνίζονται την Myc για τη δέσμευση του διαθέσιμου Max (οι πρωτεΐνες Mxd όπως και οι Myc δεν ομοδιμερίζονται αλλά ούτε συνδέονται στο DNA ως μονομερή). Οι πρωτεΐνες Mxd και Mnt σχηματίζουν ετεροδιμερή με τη Max και επάγουν τη μεταγραφική καταστολή δρώντας ως ανταγωνιστές του ετεροδιμερούς Myc-Max για την δέσμευση στα ίδια E-boxes (**Εικόνα 8**). Η κατασταλτική μεταγραφική δραστηριότητα προκύπτει από το γεγονός πως τα παραπάνω ετεροδιμερή έλκουν στοιχεία της αποακετυλάσης ιστόνης Sin3. Οι παράγοντες Mnt και Mxd διαθέτουν μια περιοχή που ονομάζεται SID και εντοπίζεται κοντά στο N-άκρο τους. Μέσω αυτής αλληλεπιδρούν άμεσα με έναν α-ελικοειδή τομέα (PAH) εντός του Sin3 επάγοντας την αλληλεπίδραση του συμπλόκου Sin3 με τις αποακετυλάσες ιστόνης HDAC1 και HDAC2 με αποτέλεσμα τη μεταγραφική σίγαση. Συνεπώς, η μεταγραφική ενεργοποίηση ή η μεταγραφική αποσιώπηση είναι αποτέλεσμα ανταγωνισμού αφενός για τα διαθέσιμα Max προκειμένου να σχηματιστούν ετεροδιμερή, αφετέρου για την δέσμευση των E-box στα γονίδια στόχους. Αν στα γονίδια αυτά συνδεθεί το ετεροδιμερές Myc-Max τα γονίδια αυτά ενεργοποιούνται ενώ αν συνδεθεί κάποιο από τα ετεροδιμερή Max-Mxd, Max-Mnt τα γονίδια αυτά απενεργοποιούνται και δεν μεταγράφονται.

Η Max μπορεί να σχηματίσει ασταθή ετεροδιμερή σε φυσιολογικά επίπεδα αλλά αδυνατεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή, ενώ σε περιπτώσεις υπερέκφρασης επάγεται η μεταγραφική καταστολή. Μάλιστα, η υπερέκφραση της Max σε διάφορους τύπους καρκίνου συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Η πρωτεΐνη Max διαθέτει πολλαπλές ισόμορφες που παράγονται με εναλλακτικό μάτισμα. Η κυρίαρχη ισόμορφη είναι μια πρωτεΐνη 160 αμινοξέων ενώ η μορφή Δ-Max στερείται 61 αμινοξέα από το C-τελικό άκρο. Η υπερφωσφορυλίωση της Max αποκλείει τον ομοδιμερισμό Max-Max αλλά όχι τον ετεροδιμερισμό Myc-Max. Η μορφή Δ-Max δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί λόγω της απώλειας των 61 αμινοξέων, κατά συνέπεια αυξάνει η μεταγραφική δραστηριότητά του ετεροδιμερούς και προωθείται ο ογκογόνος μετασχηματισμός.

Το δίκτυο επεκτείνεται περαιτέρω με την πρωτεΐνη bHLHZ Mlx που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Mxd1, Mxd4 και Mnt. Τα ετεροδιμερή που σχηματίζονται δρουν κατασταλτικά ανταγωνιζόμενα τα ίδια E-boxes με τα ετεροδιμερή Myc-Max. Το Mlx διμερίζεται επίσης με άλλους δύο παράγοντες μεταγραφής τον MondoA (MLXIP) και τον ChREBP (MondoB ή MLXIPL) (**Εικόνα 8**). Οι πρωτεΐνες Mondo A και B είναι πρωτεΐνες πυρηνικής μεταφοράς που εδράζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στο κυτταρόπλασμα. Τα ετεροδιμερή MondoA-Mlx και ChREBP-Mlx δεσμεύουν E-boxes και δρουν ως παράγοντες ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών ρυθμίζοντας τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της γλουταμίνης. Σε αντίθεση με τις Myc και Max, οι οποίες είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, οι ChREBP, MondoA και Mlx είναι «υπό όρους πυρηνικές» καθώς μετατοπίζονται στον πυρήνα μόνο όταν δεσμεύουν μεταβολίτες όπως γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, 2,6-διφωσφορική φρουκτόζη, λακτόζη και αδενοσίνη. Η μείωση των σταγονιδίων λίπους, μαζί με τους παραπάνω μεταβολίτες, επιτρέπει στα MondoA και ChREBP να μετατοπιστούν στον πυρήνα και να ενεργοποιήσουν τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η δράση των συγκεκριμένων ετεροδιμερών είναι ανταγωνιστική των ετεροδιμερών Myc-Max (Prochownik & Wang, 2022).



**Εικόνα 8:** Τα ετεροδιμερή *Myc-Max* συνδέονται σε *E-boxes* στα γονίδια-στόχους. Στη συνέχεια προσλαμβάνουν ένζυμα που τροποποιούν τη χρωματίνη, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης και οι συναπταγόνοι μεταγραφής, οι οποίοι μεσολαβούν την ακετυλίωση και την απομεθυλίωση ιστονίων γονιδίων στόχων με αποτέλεσμα τη διέγερση της μεταγραφής. Η μεταγραφική καταστολή των ενεργοποιημένων από *Myc* γονιδίων διαμεσολαβείται από έξι «πρωτεΐνες *Mxd*» (*Mxd1-4*, *Mnt* και *Mga*) των οποίων τα επίπεδα έκφρασης ποικίλλουν ανάλογα με τον ιστό, την ανάπτυξη, την ηλικία και τον κυτταρικό κύκλο. Αυτές σχηματίζουν ετεροδιμερή με τη *Max* που ανταγωνίζονται τα ετεροδιμερή *Myc-Max* για τα *E-boxes*, στρατολογώντας αποακετυλάσες ιστόνης, μεθυλοτρανσφεράσες και σύμπλοκα που μεσολαβούν την άμεση μεταγραφική καταστολή. Οι παράγοντες τύπου *Myc* *MondoA* και *ChREBP* ετεροδιμερίζονται με *Mlx*, δεσμεύουν ορισμένους μεταβολίτες όπως γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, γαλακτικό και αδενοσίνη και μετατοπίζονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου συνδέονται με γονίδια-στόχους που περιέχουν *ChoREs* και *E-box*. Συνεπώς ελέγχουν ένα υποσύνολο γονιδίων στόχων του *Myc-Max* που σχετίζεται κυρίως με τον μεταβολισμό της γλυκόζης και της γλουταμίνης (Prochownik & Wang, 2022).

### 1.5 Δομικές πτυχές των αλληλεπιδράσεων *Myc-Myc*, *Max-Max* και *Myc-Max*

Τα διαθέσιμα κρυσταλλογραφικά δεδομένα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τους καθοριστικούς παράγοντες που διέπουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις του προτιμώμενου σχηματισμού ετεροδιμερών *Myc-Max* έναντι του ομοδιμερούς *Max-Max* αλλά και του μη σχηματισμού ομοδιμερών *Myc-Myc*. Επίσης παρέχουν διαφωτιστικά στοιχεία σχετικά με τον τρόπο αναγνώρισης των *E-box* του DNA από το ετεροδιμερές *Myc-Max*.

Οι τομείς *Myc/Max* bHLHLZ αποτελούνται από δύο συνεχόμενες α-έλικες που χωρίζονται από έναν τυχαίο βρόχο. Το πρώτο τμήμα α-έλικας περιλαμβάνει υπολείμματα από τη βασική περιοχή (b) και την έλικα 1 (H1) ενώ το δεύτερο τμήμα περιλαμβάνει την έλικα 2 (H2) και το φερμουάρ λευκίνης (LZ). Ένα διατηρημένο υπόλειμμα pro στο τέλος της H1 επάγει τη δημιουργία του βρόχου που διασυνδέει τα δύο ελικοειδή τμήματα.

Το ομοδιμερές *Max* και το ετεροδιμερές *Myc-Max* αποτελούνται από δύο μονομερή bHLHLZ που αναδιπλώνονται σε μια παράλληλη δέσμη τεσσάρων ελίκων. Τα δύο ελικοειδή τμήματα στο C-άκρο σχηματίζουν την περιοχή διμερισμού παράλληλης, περιελιγμένης σπείρας (LZ)

ενώ τα υδρόφοβα υπολείμματα που περιέχονται στις έλικες H1 και H2 της δέσμης τεσσάρων ελίκων, σχηματίζουν έναν υδρόφοβο σφαιρικό πυρήνα που συμβάλει στη σταθεροποίηση του ομο- ή ετεροδιμερούς αντίστοιχα. Τέλος, οι δύο βασικές περιοχές, που προεξέχουν από το N-άκρο της δέσμης, μέσω εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων αναγνωρίζουν και δεσμεύουν E-box των γονιδίων στόχων (Carabet et al., 2018).

Τα υπολείμματα της περιοχής LZ καθορίζουν το προτιμητέο σχηματισμό ετεροδιμερών Myc-Max σε σχέση με τα ομοδιμερή Max-Max αλλά και την αδυναμία σχηματισμού ομοδιμερών Myc-Myc υπό φυσιολογικές συνθήκες, ασκώντας σταθεροποιητικές ή αποσταθεροποιητικές επιδράσεις στο διμερές ανάλογα τη περίπτωση. Αναλυτικότερα, η δημιουργία ετεροδιμερών έγκειται στη διεπαφή δίκλωνων περιελιγμένων σπειρών των περιοχών LZ που ακολουθούν το σύστημα επανάληψης επτάδων που χαρακτηρίζεται από 3 με 4 επαναλήψεις υδρόφοβων υπολειμμάτων στις θέσεις a και d και την ύπαρξη υπολειμμάτων με πολικές πλευρικές αλυσίδες στις θέσεις g και e. Σε ένα υποτιθέμενο ομοδιμερές MYC-LZ, άμεσες διεπιφανειακές ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ των θέσεων στα υπολείμματα Glu410 (E410), Glu417(E417) και Arg424(R424) θα ήταν εξαιρετικά αποσταθεροποιητικές γεγονός που οδηγεί σε χαμηλή πιθανότητα ύπαρξης του ομοδιμερούς υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Σε αντίθεση, με το MYC-LZ, το MAX-LZ στερείται των διεπιφανειακών ηλεκτροστατικών απώσεων που είναι χαρακτηριστικές του MYC-LZ. Παρόλα αυτά, η παρουσία των Met74 (M74) και His81(H81) στις θέσεις d και των Asn78 (N78) και Asn92(N92) στις θέσεις a αποδυναμώνουν το ομοδιμερές LZ σε σύγκριση με ένα ιδανικό περιελιγμένο σπείραμα.

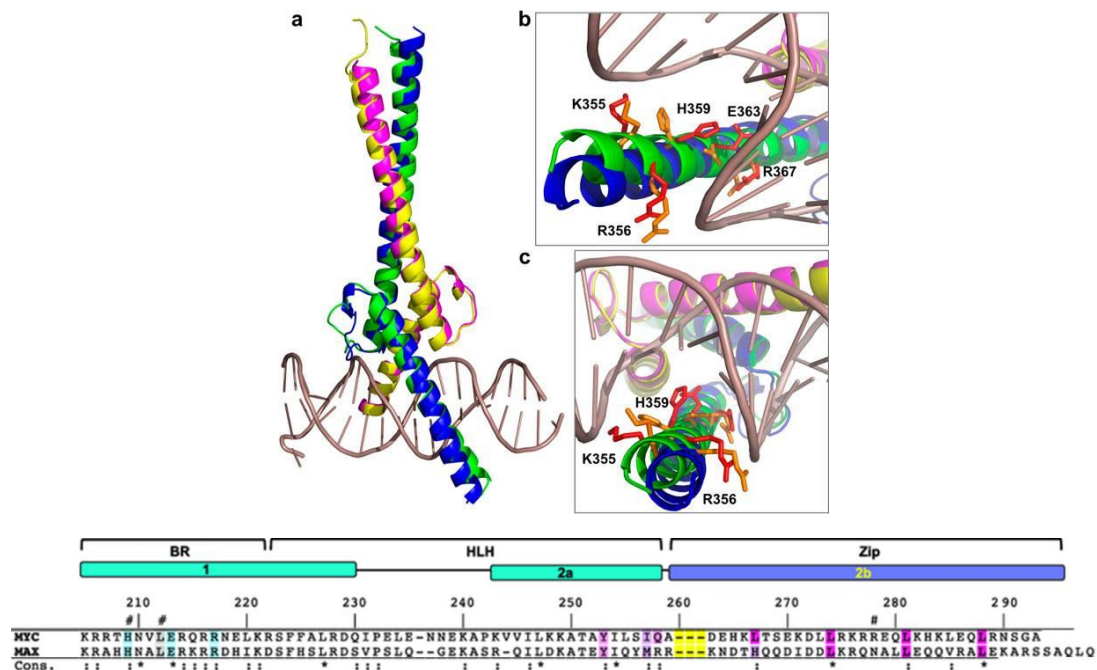
Τέλος, στη περίπτωση ανάμειξης των MYC-LZ και MAX-LZ ο σχηματισμός ετεροδιμερών είναι σχεδόν αυθόρμητος αφού οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων είναι σχεδόν συμπληρωματικές. Είναι ενδιαφέρον πως η σταθερότητα και η ελικότητα του ετεροδιμερούς περιελιγμένης σειράς MYC/MAX διαμορφώνεται επίσης από το pH, με μέγιστη ελικότητα γύρω στο pH 4,5. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία των ευνοϊκών διεπιφανειακών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων για τη σταθεροποίηση του ετεροδιμερούς, συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης, μεταξύ της ιονιζόμενης πλευρικής αλυσίδας της His81(H81) του MAX-LZ και των πλευρικών αλυσίδων Glu410 (E410) και Glu417 (E417) του MYC-LZ που βρίσκονται εντός της υδρόφοβης διεπαφής του LZ. Πράγματι, μια τέτοια τιμή pH αντιστοιχεί θεωρητικά στην υψηλότερη σχετική αφθονία αρνητικών και θετικών φορτίων, οδηγώντας έτσι σε βελτιστοποιημένες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στη διεπιφάνεια ετεροδιμερών. Αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο υψηλή συγκέντρωση φορτισμένων μορίων και τιμές pH κάτω από το ουδέτερο μιμούνται, κατά έναν τρόπο, το φυσιολογικό πυρηνικό πλαίσιο (Beaulieu et al., 2020).

Μελέτες NMR έχουν δείξει πως σε μορφή apo (δηλαδή σε κατάσταση όπου το διμερές δε δεσμεύει το DNA) οι βασικές περιοχές χαρακτηρίζονται από δομική πλαστικότητα ενώ η ελικοειδής διαμόρφωση λαμβάνεται μόνο κατά τη δέσμευση του DNA μέσω ενός μηχανισμού επαγόμενης προσαρμογής (Sammak et al., 2019).

Συγκεκριμένα, τρία αμετάβλητα υπολείμματα εντός της βασικής περιοχής είναι υπεύθυνα για τις ειδικές αλληλεπιδράσεις αναγνώρισης με την αλληλουχία DNA 5'-CACGTG-3': τα υπολείμματα His, Glu και Arg στις θέσεις His28, Glu32 και Arg35 στη Max και His359, Glu 363 και Arg 367 στη Myc. Η His αναπτύσσει δεσμό H με τη κεντρική γουανίνη του E-box υπαγορεύοντας την ειδικότητα για μια βάση πουρίνης σε αυτή τη θέση. Το Glu σχηματίζει δύο δεσμούς H με την αδενίνη και την κυτοσίνη στις θέσεις 2 και 3 της αλληλουχίας του E-box ενώ η Arg αλληλεπιδρά με τη κεντρική γουανίνη και παράλληλα με τη φωσφορική ομάδα μεταξύ της κυτοσίνης και της αδενίνης στην πρώτη και δεύτερη θέση του εξανουκλεοτιδίου, υπαγορεύοντας την ταυτότητα του κεντρικού 5'-CG-3' δινουκλεοτιδίου του E-Box. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ετεροδιμερούς - E-Box σταθεροποιείται περαιτέρω με τη δημιουργία

επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA και της H1 (Lys371), του βρόχου (Lys389) και της βασικής περιοχής (Lys355, Arg 356 και Lys392) της Myc. Τα κατάλοιπα της H1 και του βρόχου είναι διατηρημένα σε ισοδύναμες θέσεις στο Max και αλληλεπιδρούν επίσης με το φωσφορικό σκελετό (Beaulieu et al., 2020; Carabet et al., 2018) (Εικόνα 9).

Επιπρόσθετα, όπως αποκαλύπτεται από πειράματα CD και NMR ο μηχανισμός μοριακής διάκρισης του κατάλληλου E-box από το διμερές περιλαμβάνει έναν συνδυασμό διαμορφωτικής επιλογής και επαγόμενης προσαρμογής. Απουσία DNA, η BR εμφανίζει εξαιρετικά δυναμική συμπεριφορά υιοθετώντας μόνο μερικώς αναδιπλωμένες δομές. Κατά τη δέσμευση του DNA από το διμερές, οι περιοχές τις BR εισέρχονται στη κύρια αύλακα του μορίου και αλληλεπιδρούν με τις βάσεις του E-Box. Η δέσμευση αυτή ακολουθείται από μια διαμορφωτική αλλαγή της BR του ετεροδιμερούς που υποβοηθάται από την επαγόμενη προσαρμογή του DNA και έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ υπολειμάτων του βρόχου και του φωσφορικού σκελετού του DNA. Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί στη σταθεροποίηση του διμερούς με το κατάλληλο E-Box ή στην αποσταθεροποίηση όταν δεσμεύεται σε μη ειδικές αλληλουχίες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως εκτός της κανονικής αλληλουχίας E-box 5'-CACGTG-3' που αναγνωρίζεται τόσο από τα ομοδιμερή MAX όσο και τα ετεροδιμερή MYC/MAX, μπορούν επίσης να συνδεθούν σε μια ποικιλία μη κανονικών αλληλουχιών E-box (CANNTG), με διαφορετική προτιμησιακή σειρά (Beaulieu et al., 2020; Carabet et al., 2018).



**Εικόνα 9:** Κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς Myc-Max δεσμευμένο στο DNA. Στο παραπάνω σχήμα παρουσιάζονται και τα αμινοξικά κατάλοιπα που καθορίζουν και σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση Myc-Max-DNA καθώς και οι αμινοξικές αλληλουχίες της περιοχής bHLHLZ των Myc και Max (Pogenberg et al., 2012 ; Sammak et al., 2019).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η περιοχή HLH της c-MYC είναι ο στόχος πολλών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της ακετυλίωσης, της ουβικουτινιοποίησης και της σουμυλίωσης. Δύο σημαντικές θέσεις φωσφορυλίωσης της c-Myc είναι η Thr358 που βρίσκεται στη περιοχή του βρόχου και



αλληλεπιδρά απευθείας με το φωσφορικές ομάδες του DNA και η Ser373 που βρίσκεται στην H1 αλληλοεπιδρώντας με τη Max. Στη πρώτη περίπτωση η φωσφορυλίωση του καταλοίπου Thr358 αποσταθεροποιεί την αλληλεπίδραση του ετεροδιμερούς με το DNA ενώ στη δεύτερη περίπτωση η φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser373 δυσχεραίνει τον ετεροδιμερισμό Myc-Max. Η ταυτόχρονη φωσφορυλίωση και των δύο καταλοίπων αίρει τον ετεροδιμερισμό Myc-Max (Beaulieu et al., 2020).

### **1.6 Απορρύθμιση Myc και καρκινογένεση**

Η απορρύθμιση της MYC συμβάλει στη προώθηση και τη διατήρηση πολλών τύπων καρκίνου. Οι γονιδιωματικές αλλοιώσεις διεγείρουν την αύξηση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης και συνιστούν έναν από τους βασικούς μηχανισμούς απορρύθμισης της. Υφίστανται τρεις κύριοι τύποι γενετικών αλλοιώσεων που συμβάλουν στην άνοδο των επιπέδων Myc: οι γονδιακές ενισχύσεις, οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και οι μεταλλάξεις (Dhanasekaran et al., 2022).

Οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είναι πολύ συχνές σε αιμοποιητικούς όγκους όπου οι κωδικές περιοχές της Myc μετατοπίζονται από το χρωμόσωμα 8 (όπου εδράζονται φυσιολογικά) κατάντη ισχυρών προαγωγέων όπως αυτοί των υποδοχέων βαριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών (Ig). Ένα άλλο παράδειγμα χρωμοσωμικής μετατόπισης αποτελούν τα λεμφώματα Burkitt όπου οι κωδικές Myc-αλληλουχίες μετατοπίζονται από το χρωμόσωμα 8 στα χρωμοσώματα 14, 2 και 22 όπου υφίστανται προαγωγείς γονιδίων βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας Ig, γεγονός που διεγείρει την υπερέκφραση της πρωτεΐνης (Meyer & Penn, 2008).

Η γονδιακή ενίσχυση αποτελεί έναν διαφορετικό μηχανισμό αύξησης των επιπέδων MYC. Η ενίσχυση της MYC-N είναι μια υποτροπιάζουσα αλλαγή στο νευροβλάστωμα ιδιαίτερης προγνωστικής σημασίας, ενώ η ενίσχυση MYC-L είναι συχνή στον καρκίνο του πνεύμονα (Paglia et al., 2020). Η MYC ενισχύεται γενετικά σε πολλούς τύπους συμπαγών όγκων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού και του ήπατος (Dhanasekaran et al., 2022).

Η έκφραση MYC μπορεί επίσης να αυξηθεί μέσω της εισαγωγής ανοδικών ενισχυτών από ρετροϊούς ή μέσω της ενεργοποίησης άλλων ογκογόνων οδών. Για παράδειγμα, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt-APC στον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενισχύει τη μεταγραφή πρωτεϊνικών παραγόντων όπως ο TCF και ο Myc (He et al., 1998). Ένα δεύτερο παράδειγμα ενεργοποίησης ογκογόνου οδού αποτελεί η Notch των T-κυττάρων στη λευχαιμία όπου, όπως και στη προηγούμενη περίπτωση η Myc ρυθμίζεται ανοδικά (Weng et al., 2006). Η ενίσχυση Myc μπορεί να μην οφείλεται σε ενεργοποίηση κάποιας ογκογόνου οδού αλλά σε απώλεια κάποιου ογκοκατασταλτικού παράγοντα όπως ο TGF-β. Ο TGF-β ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση της c-myc σε πλήθος καρκίνων όπως τον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, του θυροειδούς. Μάλιστα, η αντίσταση από ορισμένους τύπους καρκίνου, συσχετίζεται με την αδρανοποίηση των υποδοχέων TGF-b που οδηγεί σε ενισχυμένη δράση της c-Myc και την ανάπτυξη κακοήθειας. Βέβαια, έχει βρεθεί πως και η υπερέκφραση Myc μπορεί να υπερκεράσει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από TGF-b και να συνεχίσει απρόσκοπτα το νεοπλασματικό μετασχηματισμό (Yagi et al., 2002).

Πέραν των γενετικών αλλοιώσεων ή της ενεργοποίησης κάποιας ογκογόνου οδού, τα επίπεδα της Myc αυξάνονται, μετα-μεταφραστικά μέσω πολλαπλών μηχανισμών που επεκτείνουν τον χρόνο ημιζωής της πρωτεΐνης. Η ενεργοποίηση μιτογόνων οδών όπως η RAS-MEK-ERK, ενισχύει τη φωσφορυλίωση της ser62 της Myc με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας της. Αντίθετα, η αύξηση του χρόνου ημιζωής της Myc μπορεί να οφείλεται στη μείωση της φωσφορυλίωσης της Thr58. Η μείωση ή και απώλεια φωσφορυλίωσης σε αυτή τη θέση μπορεί προκύπτει είτε από σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου Myc είτε από αδρανοποίηση της λιγάσης FBW7. Η αδρανοποίηση της FBW7 μέσω διαγραφής, μετάλλαξης ή επιγενετικής τροποποίησης είναι συχνό φαινόμενο σε ανθρώπινους καρκίνους, όπως το καρκίνο της μήτρας

(18%), του παχέος εντέρου (16%) ή του τραχήλου της μήτρας (13%). Επίσης σε πολλούς τύπους καρκίνου η μειωμένη ρύθμιση της PP2A ή η υπερέκφραση της Pin1 οδηγούν σε σταθεροποίηση της Myc και αύξηση των ενδοκυτταρικών της επιπέδων. Συνοψίζοντας, οι μηχανισμοί που περιεγράφηκαν αποτελούν μόνο ένα μικρό τμήμα του πολυσυνθέτου φαινομένου της απορρύθμισης. Θα μπορούσε επισφαλώς να θεωρηθεί πως κάθε πρωτεΐνη έμμεσα ή άμεσα εμπλεκόμενη στη ρύθμιση της Myc μπορεί υπό κατάλληλες συνθήκες να συμβάλει στη κακοήθη αύξηση των επιπέδων της (Dhanasekaran et al., 2022).

### **1.7 Στρατηγικές στόχευσης της MYC**

Η πρωτεΐνη Myc αναγνωρίζεται ως ένας από τους πιο πολύτιμους στόχους κατά του καρκίνου, καθώς η δραστηριότητα της απορυθμίζεται στη πλειονότητα των ανθρώπινων όγκων. Η μεταγραφική απορρύθμιση, η γονιδιακή ενίσχυση, η χρωμοσωμική μετατόπιση ή οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επάγουν την ανώμαλη έκφραση και λειτουργία της Myc οδηγώντας σε νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Λόγω του κομβικού ρόλου της συγκεκριμένης ογκοπρωτεΐνης σε πολλούς τύπους καρκίνου, ένα αποτελεσματικό φάρμακο θα είχε πολύ σημαντικό αντίκτυπο στον τομέα.

Ωστόσο, η ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού φαρμάκου κατά της Myc ενέχει πολλαπλές προκλήσεις. Μια σημαντική ανησυχία είναι ότι η πλήρης αδρανοποίηση της Myc με γονιδιακές τεχνικές (CRISPR/Cas9) μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογική ομοίωση οδηγώντας σε μια μη βιώσιμη κατάσταση για τον οργανισμό. Βέβαια, σε αυτή την περίπτωση έχει αποδειχθεί πως η πλήρης αδρανοποίηση της Myc γίνεται εκπληκτικά ανεκτή. Ο πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει μια άλλη πρόκληση. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη διαθέτει τρία παράλογα (c-Myc, N-Myc και L-Myc) με εν μέρη διαφορετικές λειτουργίες τα οποία θα πρέπει να συνστοχευθούν για να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική θεραπεία. Τέλος, ίσως η μεγαλύτερη πρόκληση που πρέπει να ξεπεραστεί για την ανάπτυξη κλινικά βιώσιμων Myc-φαρμάκων είναι η εγγενώς αδόμητη φύση της πρωτεΐνης (IDP), η οποία αφενός αποκλείει την στόχευση αποτελεσματικών θυλάκων στην επιφάνειά της, αφετέρου καθιστά δύσκολο τον χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεών της με άλλους συνδέτες. Συγκεκριμένα, η αδόμητη φύση της αποτελεί μια εγγενή πρόκληση στην εφαρμογή συμβατικών προσεγγίσεων σχεδιασμού φαρμάκων που βασίζονται στη δομή.

Η πληθώρα προκλήσεων είχε καταστήσει τον εν λόγω μεταγραφικό παράγοντα -παρόλο της σημαντικότητας του για τον καρκίνο- έναν «undruggable» στόχο για πολλά χρόνια. Ωστόσο, διαφωτιστικά στοιχεία που προέκυψαν από κρυσταλλογραφικές μελέτες και μελέτες NMR αναφορικά με τη δομή της Myc, τον τρόπο ετεροδιμερισμού και την σύνδεση με το DNA, καθώς και η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών απορρύθμισης της και του βιολογικού της περιβάλλοντος, οδήγησαν στην ανάπτυξη ενός μεγάλου φάσματος στρατηγικών έμμεσης και άμεσης στόχευσης προκειμένου να μειωθεί ο Myc-εξαρτώμενος ογκογόνος μετασχηματισμός (Karadkhelkar et al., 2023).



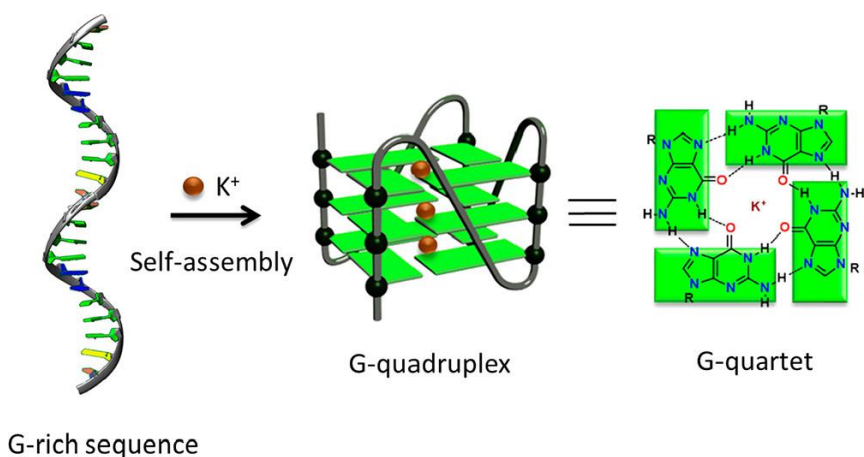
### 1.7.1 Έμμεση στόχευση της πρωτεΐνης Myc

Οι έμμεσες στρατηγικές στόχευσης περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος στρατηγικών που αποσκοπούν στην αναστολή ενός παράγοντα ρύθμισης της Myc και συνακόλουθα τη μείωση των ενδοκυτταρικών της επιπέδων. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα έμμεσων στρατηγικών αναστολής.

#### 1.7.1.1 Αναστολή της μεταγραφής Myc

##### 1.7.1.1.1 Στόχευση δομών G4

Οι G4 δομές είναι δευτεροταγείς δομές τετράκλωνου DNA που σχηματίζονται από μονόκλωνες αλληλουχίες πλούσιες σε γουανίνη (G) (Εικόνα 10). Κάθε γουανίνη αλληλεπιδρά με τις γειτονικές της μέσω της ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου τύπου Hoogsteen σχηματίζοντας μια τετράγωνη επίπεδη διάταξη, που ονομάζεται G-tetrad. Δύο ή περισσότερες τέτοιες διατάξεις στοιβάζονται για να σχηματίσουν μια τετράκλωνη ελικοειδή δομή που ονομάζεται G-quantraplex ή G4. Η δομή G4 σταθεροποιείται από μονοσθενή κατιόντα -κυρίως  $K^+$  και  $Na^+$ - που τοποθετούνται στο κέντρο των στοιβαγμένων G-tetrad και εξουδετερώνουν την ηλεκτροστατική άπωση των οξυγόνων γουανίνης ( $O_6$ ).



*Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση δομής G4 του DNA (Chaudhuri et al., 2021).*

Το στοιχείο υπερευαισθησίας της νουκλεάσης III 1 (NHE III 1 ) του γονιδίου Myc που βρίσκεται 142-115 bp ανάντη του προαγωγέα P1 ελέγχει το 80-95% της μεταγραφικής δραστηριότητας του γονιδίου ανεξάρτητα του προαγωγέα που χρησιμοποιείται. Η πλούσια σε G αλληλουχία του NHE III1 27 bp, επίσης γνωστή ως Pu27, μπορεί να σχηματίσει μια ενδομοριακή παράλληλη διαμόρφωση που διαθέτει τρεις G-tetrad. Η διευθέτηση αυτή επάγει την μεταγραφική καταστολή του γονιδίου Myc και κατά συνέπεια, η σταθεροποίηση της από μικρά μόρια αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο τρόπο έμμεσης στόχευσης της Myc.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα εκλεκτικού μορίου που είναι ικανό να σταθεροποιήσει G4 δομές του γονιδίου Myc ( σταθεροποιεί εκλεκτικά Myc-G4 έναντι G4-BCL-2 , c-KIT , VEGF και HRAS ) επάγοντας τη μεταγραφική καταστολή σε καρκινικά κύτταρα είναι το QN1. Το QN1 αντιπροσωπεύει μια διφθορο-υποκατεστημένη κινόξαλίνη που μπορεί να στοχεύσει ειδικά το c-MYC G4 μειώνοντας την έκφραση της Myc σε κύτταρα TNBC. Επίσης πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει δόσοεξαρτώμενη in vivo αντικαρκινική δράση σε μοντέλο ποντικού με καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με in vitro πειράματα καθιστούν το QN1 ένα πολλά υποσχόμενο μόριο για την εκλεκτική σταθεροποίηση των Myc-G4.

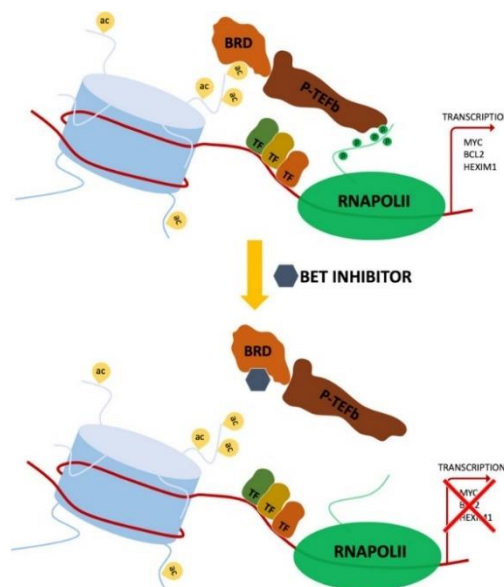
Το APTO-253 αποτελεί ένα άλλο παράδειγμα μορίου που μειώνει την έκφραση του MYC μέσω της σταθεροποίησης του MYC-G4 και αξιολογείται επί του παρόντος σε πρώιμα στάδια

κλινικών δοκιμών. Ωστόσο, βιοφυσικές μελέτες αποκάλυψαν πως το APTO-253 εκτός των Myc-G4 μπορεί επίσης να σταθεροποιήσει G4 δομές στα τελομερή και τον προαγωγέα KIT. Η σταθεροποίηση των δομών G4 από το APTO-253 έχει συσχετιστεί με την επαγωγή διακοπής του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση κυττάρων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML). Αντίστοιχα, η κλινική μελέτη (Φάσης I) του συγκεκριμένου μορίου προσανατολίζεται επί του παρόντος σε δοκιμές AML και μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (MDS).

Προκειμένου να ξεπεραστεί η περιορισμένη εκλεκτικότητα των G4-συνδετών, έχει αναφερθεί πρόσφατα η ανάπτυξη πεπτιδίων θειαζόλης που διεισδύουν στα κύτταρα και στοχεύουν ειδικά τις δομές G4 του προαγωγέα MYC. Το τριπεπτίδιο θειαζόλης TH3 αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου πεπτιδίου που εμφάνισε ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση σε διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές - HeLa και A549-, παρουσιάζοντας παράλληλα αμελητέα κυτταροτοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, τέτοιου είδους πεπτίδια πιθανώς να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη εξαιρετικά εκλεκτικών ενώσεων κατά των Myc-G4 δομών (Chaudhuri et al., 2021).

### 1.7.1.1.2 Στόχευση πρωτεϊνών BET

Μια διαφορετική προσέγγιση που μπορεί να επηρεάσει τη μεταγραφή Myc είναι η στόχευση του μεταγραφικού συμπλέγματος Brd4 που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών Bromo and Extra-Terminal domain (BET). Ο BRD4 αποτελείται από μια εξωτερματική περιοχή (ET) που αλληλεπιδρά με αρκετούς τροποποιητές ιστόνης και ένζυμα αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων που εξαρτώνται από ATP, δύο N-τερματικές bromodomains (BD1 και BD2) που αποτελούνται από τέσσερις α-έλικες που διαχωρίζονται από περιοχές μεταβλητού βρόχου και αναγνωρίζουν ακετυλιωμένη λυσίνη και μια C-τερματική περιοχή (CTD) που αλληλεπιδρά με τον θετικό παράγοντα επιμήκυνσης μεταγραφής b (P-TEFb). Ο BRD4 αντιπροσωπεύει έναν επιγενετικό ρυθμιστή της μεταγραφής του γονιδίου Myc και κατά συνέπεια αποτελεί ένα ελκυστικό στόχο για την έμμεση στόχευση του. Με βάση αυτή τη στρατηγική οι έρευνες στράφηκαν στην ανάπτυξη αναστολέων BET πρωτεϊνών. Σήμερα αν και υπάρχουν παραπάνω από 40 αναστολείς BET όλοι τους ακολουθούν έναν κοινό μηχανισμό (**Εικόνα 11**). Οι αναστολείς BET ανταγωνίζονται τα ακετυλιωμένα υπολείμματα λυσίνης για τη δέσμευση στους BD1 και BD2, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των BET πρωτεϊνών από την χρωματίνη και τη διακοπή της μεταγραφής βασικών ογκογονιδίων συμπεριλαμβανομένου του Myc.



**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού των αναστολέων BET. Οι πρωτεΐνες BET συνδέονται με υπερακετυλιωμένες ιστόνες, επάγοντας την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης τοπικά με

αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων. Οι αναστολείς BET ανταγωνίζονται τα ακετυλιωμένα υπολείμματα των ιστονών μέσω της δέσμευσης τους στους βρωμοτομείς αίροντας τη δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης των BET (Spriano et al., 2020).

Τα πρώτα αποτελέσματα αναστολής πρωτεϊνών BET προήλθαν από κύτταρα πολλαπλού μυελώματος (MM) που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το μόριο JQ1. Η θεραπεία με την ένωση αυτή οδήγησε σε μείωση της μεταγραφής MYC, ακολουθούμενη από μείωση των εξαρτώμενων από MYC γονιδίων-στόχων. Ωστόσο, παρά τη θετική απόκριση της Myc σε αναστολείς BET, η δράση που ασκούν σε λεμφώματα, MM και διαχυτικές κυτταρικές σειρές λεμφώματος μεγάλων Β κυττάρων (DLBCL) με ελάχιστες εξαιρέσεις είναι κυτταροστατική. Επιπλέον, η δραστηριότητα μικρών μορίων που στοχεύουν τις πρωτεΐνες BET δεν σχετίζεται αυστηρά με τη μείωση των επιπέδων MYC αλλά επηρεάζει και άλλα βασικά γονίδια, όπως NMYC, IL7R, IL6, IL10 FOSL1, AR, ER, BCL2, BCL6, PAX5, CDK4, HIST2H2BE και CDK6. Εκτός από τη ρύθμιση των κωδικών γονιδίων, οι αναστολείς BET επηρεάζουν και την έκφραση μη κωδικών RNA όπως τα miR-21-3p και miR-155-5p.

Προκειμένου να ξεπεραστεί η αναστρέψιμη κυτταροστατική δραστηριότητα των αναστολέων BET, η έρευνα στράφηκε στην ανάπτυξη αποικοδομητών BET που βασίζονται στη στρατηγική χίμαιρας στόχευσης πρωτεόλυσης (PROTAC). Τα PROTAC είναι διλειτουργικά μόρια που αποτελούνται από μια περιοχή που συνδέεται με την πρωτεΐνη-στόχο και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια δεύτερη περιοχή που αναγνωρίζεται από τις λιγάσες ουβικιτίνης E3. Οι αποικοδομητές BET αποτελούνται από έναν ειδικό δεσμευτικό παράγοντα BET συνήθως JQ1 συνδεδεμένο με το μοτίβο αναγνώρισης λιγάσης ουβικιτίνης E3, το οποίο πυροδοτεί την ουβικουϊτινοποίηση των πρωτεϊνών BET και την αποικοδόμησή τους με τη μεσολάβηση του πρωτεασώματος. Ο πρώτος αποικοδομητής BET που αναφέρθηκε το 2015 ήταν ο dBET1 στον οποίο ένας συνδετήρας οκτώ ατόμων συνδέει το JQ1 με τη θαλιδομίδη. Ο dBET1 προκάλεσε αξιοσημείωτη εξάντληση του BRD4 σε 1 ώρα και πλήρη αποικοδόμηση σε 2 ώρες θεραπείας σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά AML (MV4-11), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση με το JQ1 ή τη θαλιδομίδη ως μεμονωμένες θεραπείες. Χάρη στην πλήρη εξάντληση του επιπέδου πρωτεΐνης BRD4 και την επακόλουθη μείωση των επιπέδων MYC, οι αποικοδομητές BET παρουσιάζουν ισχυρότερη in vitro δραστηριότητα από τους αναστολείς BET (Winter et al., 2015).

Συνεπώς η έμμεση στόχευση Myc με αναστολής BET είναι εφικτή και παρά τις δυσκολίες, η έρευνα στον τομέα αυτόν έχει αποδώσει δραστικές ενώσεις που επί του παρόντος αξιολογούνται σε προκλινικά και πρώιμα κλινικά στάδια. Η επίδραση αυτών των ενώσεων θα μπορούσε να αυξηθεί μέσω συνδυασμού με άλλους τύπους αναστολέων. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραδείγματα συνδυασμού αναστολέων BET με αναστολείς μεθυλοτρασφερασών DNA και αποακετυλασών ιστόνης, όπως επίσης και με αναστολείς της PI3K. Η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να αποφέρει πολύ ισχυρότερη μείωση των επιπέδων Myc αποτελώντας μια καινοτόμα στρατηγική στόχευσης (Spriano et al., 2020).

### **1.7.1.2 Στόχευση μετάφρασης mRNA του MYC**

#### **1.7.1.2.1 Στόχευση της πρωτεΐνης mTOR**

Η mTORC1 αποτελεί έναν βασικό παράγοντα της πρωτεϊνοσύνθεσης του Myc-mRNA. Διαθέτει ως καταλυτική υπομονάδα μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που ονομάζεται mTOR και εμπλέκεται στη φωσφορυλίωση υποστρωμάτων όπως η κινάση S6K1 που με την σειρά της φωσφορυλιώνει υποστρώματα που προωθούν την έναρξη της μετάφρασης και τον παράγοντα 4E-BP1 που με την φωσφορυλίωση του αποδεσμεύεται από τον eIF4E, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση του με τον eIF4G και συνακόλουθα την έναρξη της μετάφρασης. Η mTORC1 αποτελεί έναν ελκυστικό φαρμακολογικό στόχο κατά της Myc και αυτό φάνηκε εκ πρώτης από το γεγονός πως η χρήση ραπαμυκίνης (αναστολέας mTOR) σε κοκκιοκύτταρα μείωσε τα επίπεδα ενδογενούς MYC, ενώ δεν επηρέασε τα κυτταρικά επίπεδα του Myc-mRNA (Wall et al., 2008). Ο MLN0128, ένας διπλός αναστολέας επόμενης γενιάς φαίνεται πως έχει τη

δυνατότητα να ξεπεράσει τα τυπικά ανάλογα ραπαμυκίνης μέσω της αναστολής των TORC1 και TORC2. Ο αναστολέας αυτός αξιολογείται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές φάσης 1 και 2. Τα *in vivo* αποτελέσματα του συγκεκριμένου αναστολέα ήταν αρκετά υποσχόμενα σε μοντέλο διαγονιδιακού ποντικού Εμ-Myc (το μοντέλο αυτό μιμείται πιστά το ανθρώπινο λέμφωμα Burkitt στο οποίο η υπερέκφραση της Myc των Β-κυττάρων οδηγεί σε λεμφογένεση) όπου μετά τη χρήση του, η φωσφορυλίωση του 4EBP1 από τον mTORC1 (η φωσφορυλίωση του 4EBP1 συσχετίζεται θετικά με την υπερέκφραση Myc σε ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα μεγάλων Β κυττάρων) διακόπηκε και το φορτίο όγκου μειώθηκε. Ωστόσο, σε πρόσφατη κλινική μελέτη φάσης 2 σε ασθενείς με μεταστατικό, ανθεκτικό στον ευνουχισμό καρκίνο του προστάτη (mCRPC), η θεραπεία με MLN0128 συσχετίστηκε με τοξικότητα και μειωμένη αποτελεσματικότητα (Graham et al., 2018). Παρά τα διαφορούμενα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση τέτοιων αναστολέων στην mTOR, αποτέλεσαν τη βάση για την ανάπτυξη καινούργιων ενώσεων όπως οι συνδεδεμένοι αναστολείς mTOR τρίτης γενιάς -RapaLink-1-. Οι αναστολείς αυτού του τύπου περιέχουν έναν αναστολέα πρώτης γενιάς όπως η ραπαμυκίνη (οι αναστολείς αυτοί συνδέονται με την περιοχή FBR της mTOR) συνδεδεμένο με έναν αναστολέα δεύτερης γενιάς γνωστούς και ως TORKi (οι αναστολείς αυτοί συνδέονται με την περιοχή κινάσης της mTOR) και παρουσιάζουν πολύ αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τους μεμονωμένους αναστολείς. Τέτοιοι ισχυροί αναστολείς mTORC1/2 θα μπορούσαν να είναι πολύτιμοι υποψήφιοι για τη θεραπεία του καρκίνου που οδηγείται από Myc (Rodrik-Outmezguine et al., 2016).

#### **1.7.1.2.2 Στόχευση των πρωτεϊνών 4E-BP και eIF4A**

Η άμεση στόχευση της mTOR ενδέχεται να αποτύχει να αναστείλει τη μετάφραση του mRNA της MYC αφενός λόγω της ανεπαρκούς δέσμευσης του eIF4E από τα ενδογενή επίπεδα 4E-BPs αφετέρου από την ανεξάρτητη δράση (σε σχέση με τον 4E-BP) του eIF4E στη μετάφραση του Myc-mRNA, στην περίπτωση ύπαρξης θέσεων εσωτερικού τμήματος εισόδου ριβοσώματος (IRES) στο 5'-UTR. Μια πολύ ελκυστική λύση είναι η στόχευση της ελικάσης eIF4A. Η eIF4A ξετυλίγει τα G-quantraplex του Myc-mRNA και δίχως τη δράση της η μετάφραση διακόπτεται. Ένας ισχυρός αναστολέας της ελικάσης eIF4A το Silvestrol μπόρεσε να αναστείλει τη μετάφραση Myc και την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλα ποντικού καρκίνου του παχέος εντέρου (CRC) (Wiegering et al., 2015). Ομοίως, ο eFT226, ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας eIF4A, είναι ικανός να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να επάγει γρήγορα τον κυτταρικό θάνατο σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος Β-κυττάρων. Το θεραπευτικό όφελος της αναστολής του eIF4A από το eFT226 μεσολαβείται εν μέρει από μια συντονισμένη μείωση των επιπέδων βραχύβιων ογκοπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των MYC, Cyclin D1 και MCL1, οι οποίες είναι οδηγοί πολλαπλασιασμού και επιβίωσης των Β-κυττάρων. Μάλιστα, η θεραπεία με eFT226 εμφάνισε ισχυρή *in vivo* αντικαρκινική δράση σε ένα ευρύ σύνολο μοντέλων ξеноμοσχευμάτων λεμφώματος συμπεριλαμβανομένων των DLBCL (ABC και GCB) και λεμφώματος Burkitt (Thompson et al., 2021).

#### **1.7.1.2.3 Στόχευση των Myc-mRNAs με ASOs και siRNAs**

Δεδομένου ότι πολύ τύποι καρκίνου βασίζονται στη συνεχή έκφραση MYC, μια αξιοσημείωτη προσπάθεια παρεμπόδισης της μετάφρασης της πρωτεΐνης αποτελεί η αποσταθεροποίηση του mRNA της. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια (ASOs), που στοχεύουν το c-Myc RNA. Μηχανιστικά, αυτή η προσέγγιση εκμεταλλεύεται την αναστολή της μετάφρασης του mRNA με αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης του όγκου. Τα ASO είναι βραχεία μονόκλινα μόρια DNA, συμπληρωματικά προς ένα RNA-στόχο ενός επιλεγμένου γονιδίου. Μόλις συνδεθούν με τον στόχο RNA, η αναστολή του λαμβάνει χώρα μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του ματίσματος, της αναστολής της μετάφρασης πρωτεΐνης και κυρίως μέσω της στρατολόγησης ενδογενούς RNάσης (RNase) που αναγνωρίζει το δίδυμο mRNA-ολιγονουκλεοτίδιο και διασπά τον κλώνο

RNA, αφήνοντας άθικτο το ολιγονουκλεοτίδο (Biroccio et al., 2003). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της παραπάνω κατηγορίας αποτελεί η ανάπτυξη του μορίου AVI-4126 από την AVI BioPharma που μπορεί να στοχεύσει το c-myc mRNA και δύναται να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία της επαναστένωσης, διαφόρων τύπων καρκίνου και της πολυκυστικής νεφρικής νόσου (Stephens, 2004).

Μια άλλη τακτική περιλαμβάνει τα siRNAs, τα οποία είναι δίκλιωνα RNAs (dsRNAs) που μπορούν να στοχεύσουν ένα συμπληρωματικό RNA ενός επιλεγμένου γονιδίου στόχου με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του. Ο μηχανισμός δράσης της RNAi περιλαμβάνει την επεξεργασία ενός μεγαλύτερου δίκλωνου RNA από την ριβονουκλεάση Droscha και Dicer με αποτέλεσμα τη δημιουργία siRNA που δεσμεύεται στο σύμπλοκο RISC (RNA induced silencing complex). Στη συνέχεια, εντός του συμπλέγματος RISC, οι κλώνοι siRNA διαχωρίζονται, ο ένας κλώνος απομακρύνεται και ο δεύτερος καθοδηγεί το ενεργό σύμπλοκο RISC στο 3'UTR του mRNA-στόχου. Μέσω της δράσης του RISC η μετάφραση του mRNA στόχου διακόπτεται και ανοικοδομείται (Dana et al., 2017).

Η εταιρία Dicerna χρησιμοποιώντας ένα σύστημα λιπιδικών νανοσωματιδίων για τη παροχή του RNAi προσπάθησε να δημιουργήσει ένα siRNA που στοχεύει τη Myc. Το DCR-Myc αν και σε πρώιμες κλινικές δοκιμές παρουσίασε ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη συνέχεια εγκαταλείφθηκε λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας και φτωχού φαρμακοκινητικού προφίλ. Ωστόσο, προκειμένου να ξεπεραστούν προβλήματα που έχουν να κάνουν με την ταχεία αποικοδόμηση τόσο των siRNAs όσο και των ASOs διερευνώνται νέα συστήματα χορήγησης όπως η χρήση νανοσωματιδίων και ογκολυτικών ιών (Whitfield et al., 2017).

### **1.8 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του ετεροδιμερούς Myc-Max και του συμπλέγματος Myc-Max-DNA**

Παρόλο που έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες τα τελευταία 20 χρόνια, δεν έχουν αναπτυχθεί εγκεκριμένα φάρμακα αναστολέων μικρών μορίων που να εμποδίζουν άμεσα τις αλληλεπιδράσεις Myc-Max ή τη δέσμευση του συμπλόκου με το DNA. Αυτή η δυσκολία έγκειται στη διαταραγμένη φύση της πρωτεΐνης Myc (χαρακτηρίζεται και ως αδόμενη πρωτεΐνη) και την έλλειψη αποτελεσματικών θυλάκων δέσμευσης στο ετεροδιμερές Myc-Max. Ωστόσο, σύμφωνα με δομικές μελέτες οι στρατηγικές στόχευσης του ετεροδιμερούς με μικρά μόρια περιλαμβάνουν δύο κατηγορίες :

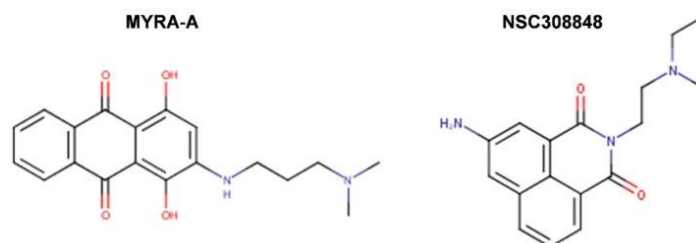
- a) Τους αναστολείς που εμποδίζουν άμεσα τη σύνδεση του Myc-Max στο DNA.
- b) Τους αναστολείς που δρουν παρεμβαίνοντας στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και εμποδίζουν τον ετεροδιμερισμό του Myc με το Max.

#### **1.8.1 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του συμπλέγματος Myc-Max-DNA**

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη ενώσεων που έχουν τη δυνατότητα να αποτρέψουν τη σύνδεση του ετεροδιμερούς Myc-Max στο DNA. Δύο από τα πρώτα μόρια που αναφέρθηκαν πως έχουν την δυνατότητα να διαταράσσουν τη σύνδεση Myc-Max-DNA δίχως να παρεμβαίνουν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης είναι τα MYRA-A και MYRA-B που αναγνωρίστηκαν από μια βιβλιοθήκη 1990 ενώσεων του NCI με μια προσέγγιση κυτταρικού ελέγχου. Από πειράματα που έγιναν σε B κύτταρα p493-6 με ρυθμιζόμενη από τετρακυκλίνη έκφραση Myc, αποκαλύφθηκε πως και οι δύο ενώσεις έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν περισσότερο τα κύτταρα με υψηλά επίπεδα Myc -p493-6 - Tet (Myc-on)- σε σχέση με αυτά που τα επίπεδα Myc είναι χαμηλά -p493-6 + Tet (Myc-off)-. Περεταίρω πειράματα σε κυτταρικές σειρές -Rat-1- που δεν εκφράζουν -HO15.19 (c-myc-null)-, διαθέτουν φυσιολογικά επίπεδα -TGR-1 (c-myc WT)- και υπερεκφράζουν myc -HOmyc3 (c-myc-overexpressing)- αποκάλυψαν πως οι MYRA-A & B επάγουν την απόπτωση

με τρόπο που εξαρτάται από τα επίπεδα Myc. Ωστόσο παρατηρήθηκε πως ο MYRA-A παρενέβη στη δέσμευση του DNA όχι μόνο των συμπλοκών Myc/Max αλλά και των διμερών Mnt/Max και Max/Max (Mo & Henriksson, 2006).

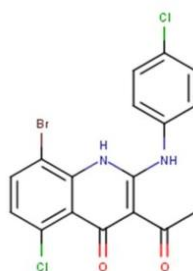
Σε μια άλλη μελέτη, οι Jeong et al. (2010) εξέτασαν μια βιβλιοθήκη 6.480 μικρών μορίων της Korea Chemical Bank με την τεχνική EMSA για την αξιολόγηση των ανασταλτικών επιδράσεων στον σχηματισμό του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA και τη χρήση της κυτταρικής σειράς HL-60 για την αξιολόγηση της επίδρασης τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αναγνωρίστηκαν αρχικά, πέντε ενώσεις που εμπόδισαν τη δέσμευση Myc-Max στο DNA, με χαμηλά IC50s -KSI-2826, FB 1503, KSI-1449, KSI-2303 και KSI-3716-. Από τις παραπάνω ενώσεις μόνο οι KSI-1449, KSI-2303 και KSI-3716 κατέστειλαν δυναμικά τον εξαρτώμενο από Myc πολλαπλασιασμό και προκάλεσαν απόπτωση των κυττάρων λευχαιμίας HL-60 μέσω διακοπής του κυτταρικού κύκλου G0/G1 χωρίς να επηρεάσουν το επίπεδο έκφρασης της Myc (Jeong et al., 2010a).



**Εικόνα 12:** Δομές των αναστολέων MYRA-A και NSC308848 (MYPA-B) (Carabet et al., 2018).

Οι Jeong et al. πρότειναν περαιτέρω ανάπτυξη του KSI-3716 ως ενδοκυτταρικού παράγοντα χημειοθεραπείας για τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, δεδομένου ότι ο KSI-3716 έχει αρκετά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που είναι κατάλληλα για τέτοια θεραπεία. Αυτά περιλάμβαναν το ιδανικό για φαρμακευτική χρήση μοριακό του βάρους, τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (logP), τη μικρή πολική επιφάνεια (PSA), την έλλειψη ενζυμικά διασπασίμων χημικών δεσμών (αμιδικούς ή εστερικούς δεσμούς) που προσδίδουν στο KSI-3716 υψηλή κυτταρική διαπερατότητα, σχετικά χαμηλό ρυθμό διάχυσης στο αίμα και σε άλλους ιστούς, καθώς και επαρκή ενδοκυτταρική συγκέντρωση κατά την απορρόφηση από την ουροδόχο κύστη και πριν την απέκκριση, και πολύ μικρή συστηματική τοξικότητα λόγω της αμελητέας διάχυσης στο αίμα, σύμφωνα με τα logS του (χαμηλή διαλυτότητα) (Jeong et al., 2010b). Είναι ενδιαφέρον ότι τα κύτταρα KU19-19/GEM (κύτταρα καρκίνου της ουροδόχου κύστης που είναι ανθεκτικά στη γεμισταβίνη) ρύθμισαν προς τα πάνω την έκφραση c-Myc παρουσία της γεμισταβίνης αναπτύσσοντας αντίσταση, η οποία αναστάλθηκε από τον KSI-3716. Η διαδοχική προσθήκη KSI-3716 και γεμισταβίνης ανέστειλε τον ανθεκτικό στη γεμισταβίνη πολλαπλασιασμό κυττάρων σε μεγάλο βαθμό από κάθε φάρμακο μόνο του. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η διαδοχική θεραπεία με KSI-3716- γεμισταβίνη μπορεί να είναι ευεργετική για ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Seo et al., 2014).

KSI-3716



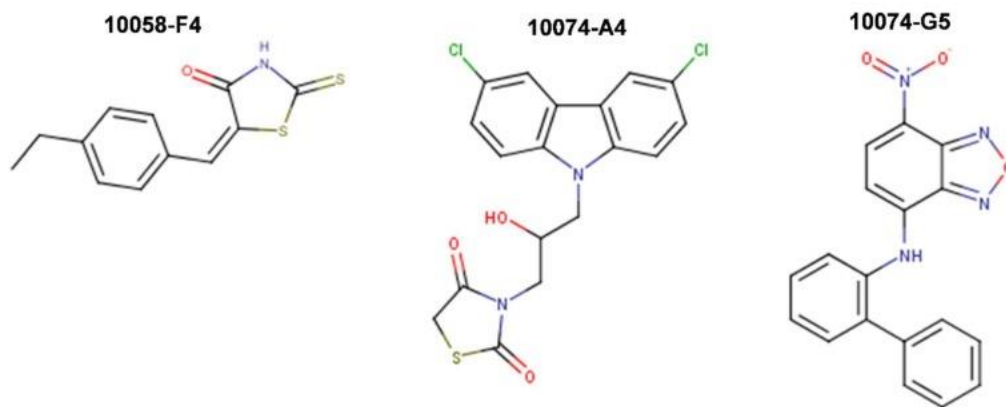
Εικόνα 13: Δομή του αναστολέα KSI-3716 (Carabet et al., 2018).

### 1.8.2 Άμεσοι αναστολείς αλληλεπιδράσεων του ετεροδιμερούς Myc-Max

Ο πρώτος αναφερόμενος αναστολέας των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης Myc-Max, IIA6B17, αναγνωρίστηκε από τους Berg et al. (2002) από μια συνδυαστική βιβλιοθήκη περίπου 7000 πεπτιδομιμητικών ενώσεων που ελέγχθηκαν *in vitro* με την τεχνική FRET (fluorescence resonance energy transfer). Η ένωση ανέστειλε το ετεροδιμερές Myc-Max αλλά εμφάνισε χαμηλή ειδικότητα αφού ανέστειλε και τον μετασχηματισμό που προκλήθηκε από c-Jun σε ινοβλάστες εμβρύου κοτόπουλου (Berg et al., 2002).

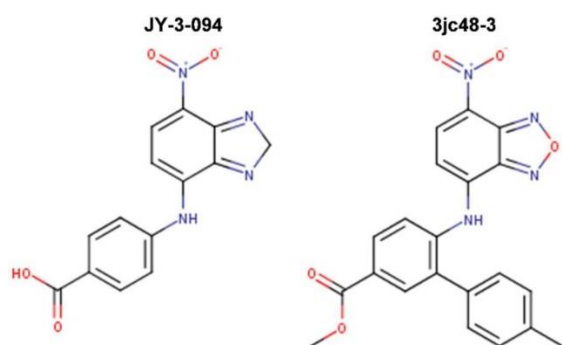
Το 2003, οι Yin et al. χρησιμοποίησαν ένα σύστημα δύο υβριδίων ζυμομύκητα για να εξετάσουν 10.000 ενώσεις από τη συνδυαστική βιβλιοθήκη Chembridge DIVERSet και από τις επτά αρχικά ανακαλυφθέντες ενώσεις (10058-F4, 10009-G9, 10050-C10, 10074-A4, 10074-G5, 10031-B8 και 10075-G5) ξεχώρισαν τρεις αναστολείς χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούσαν να διαταράξουν την αλληλεπίδραση Myc-Max στη περιοχή HLHLZ με πλήρη εξειδίκευση προς το ετεροδιμερές και χωρίς σημαντική κυτταρική τοξικότητα (Yin et al., 2003). Κατά συνέπεια, οι αναστολείς 10058-F4, 10074-A4 και 10074-G5 βοήθησαν στην επιτάχυνση της έρευνας για τη θεραπευτική στόχευση της Myc. Ωστόσο, αν και η αποτελεσματικότητα τους αποδείχθηκε σε *in vitro* δοκιμασίες (GST-pulldown) και κυτταρικές σειρές (ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος και κυτταρικές σειρές ανθρώπινου μυελώματος), η χρήση τους *in vivo* έχει περιοριστεί λόγω κακής βιοδιαθεσιμότητας, γρήγορου μεταβολισμού και ανεπαρκούς διείσδυσης στη θέση στόχου (σύμφωνα με πειράματα που έγιναν σε μοντέλα ξενομοσχεύματος Daudi Burkitt και Νευροβλαστώματος) (Fletcher & Prochownik, 2015). Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί πως ενώ η χορήγηση 10058-F4 δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλα ξενομοσχεύματος ανθρώπινου νευροβλαστώματος, η χορήγηση του σε μοντέλα γενετικά τροποποιημένων ποντικών για την ανάπτυξη νευροβλαστώματος διπλασίασε το χρόνο επιβίωσης τους (Fletcher & Prochownik, 2015).





**Εικόνα 14:** Δομές των αναστολέων 10058-F4, 10074-A4 και 10074-G5 (Carabet et al., 2018).

Σε μια μεταγενέστερη μελέτη, οι Wang et al. (2007) προσπάθησαν να αναπτύξουν πιο ισχυρά και εκλεκτικά ανάλογα του 10074-G5. Η έρευνα τους οδήγησε στην ανάπτυξη του αναλόγου JY-3-094, που έδειξε μια ισχυρότερη ικανότητα να διαταράσσει τον ετεροδιμερισμό Myc και Max, αλλά η διαπερατότητα του στα κύτταρα ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, γεγονός που αποδόθηκε στον ιονισμό του παρα-καρβοξυλικού οξέος της δομής του. Έτσι δημιουργήθηκε μια ομάδα προ-φαρμάκων μέσω της εστεροποίησης του καρβοξυτελικού οξέος που οδήγησε σε αύξηση της ενδοκυτταρικής πρόσληψης (H. Wang et al., 2013). Ο συνδυασμός του 10074-G5 και του JY-3-094 οδήγησε στην ανάπτυξη μιας νέας ένωσης που ονομάστηκε 3jc48-3. Ο 3jc48-3 έδειξε αυξημένη ισχύ και σταθερότητα σε κυτταρικές αναλύσεις και ~ 5 φορές μεγαλύτερη ισχύ στην αναστολή του διμερισμού Myc-Max από την μητρική ένωση (10074-G5) ενώ είχε κατά προσέγγιση διπλή εκλεκτικότητα για το ετεροδιμερές έναντι του ομοδιμερούς Max-Max. Επιπρόσθετα, ο 3jc48-3 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό κυττάρων HL-60 και Daudi που υπερεκφράζουν Myc με μονοψήφιες τιμές IC<sub>50</sub> της τάξης των μΜ προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Chauhan et al., 2014). Επέδειξε επίσης μεγαλύτερη ισχύ *in vitro* και αυξημένο χρόνο ημιζωής, σε μοντέλο PDX καρκίνου του προστάτη υψηλού βαθμού, με ενδείξεις επιβράδυνσης της ανάπτυξης του όγκου που αντανακλούν τις ενισχυμένες ιδιότητες του αναστολέα σε σχέση με τον προκατόχο του 10074-G5 (Shukla et al., 2022). Επιπλέον, ο ενδοκυτταρικός χρόνος ημιζωής του 3jc48-3 προσδιορίστηκε >17 ώρες. Συνολικά, ο αναστολέας 3jc48-3 θεωρείται ένας από τους πιο ισχυρούς, κυτταρικά ενεργούς και σταθερούς αναστολείς Myc που αναπτύχθηκε από την ομάδα του Wang (Chauhan et al., 2014).



**Εικόνα 15:** Δομές των αναστολέων JY-3-094 και 3jc48-3 (Carabet et al., 2018).

Περαιτέρω έρευνες από τους Kiessling et al. (2007) που στηρίχθηκαν σε διαλογή υψηλής απόδοσης μιας βιβλιοθήκης 1438 πυραζολο [1,5-α] πυριμιδινών με βάση τις ενώσεις, MycG1 και MycG2 οδήγησαν στη ταυτοποίηση ενός μικρού μορίου που μπορούσε να διαταράξει το σχηματισμό του ετεροδιμερούς Myc-Max αναστέλλοντας τη δραστηριότητα του. Το νέο μόριο που ονομάστηκε MycG3 ανέστειλε εκλεκτικά το ετεροδιμερές Myc-Max έναντι του ομοδιμερούς Max-Max και άλλων παραγόντων μεταγραφής όπως οι Jun και Fos. Επιπλέον, ο MycG3 ανέστειλε ισχυρά τον εξαρτώμενο από Myc πολλαπλασιασμό των κυττάρων



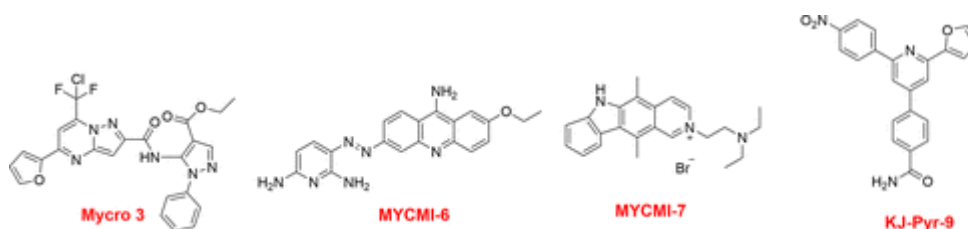
οστεοσαρκώματος U-20S (70% μείωση), ενώ δεν επηρέασε την ανεξάρτητη από Myc-Max κυτταρική σειρά PC-12 (που στερείται την πρωτεΐνη Max) (Kieślting et al., 2007).

Η δραστηριότητα του Myscro3 κατά του ετεροδιμερούς Myc-Max αναδείχθηκε από τη προκλινική μελέτη των Stellas et al. Στη συγκεκριμένη μελέτη το Myscro3 παρουσίασε ένα εξαιρετικό παράθυρο ειδικότητας (IC50 0,25 έναντι 9,0  $\mu\text{M}$  για κύτταρα με άθικτα αλληλόμορφα Myc και κύτταρα Myc-null, αντίστοιχα) μεταξύ των ενώσεων που αξιολογήθηκαν *in vitro* στην ικανότητα αναστολής του ετεροδιμερούς, στις κυτταρικές σειρές TGR-1 (Myc<sup>+/+</sup>) και H015.19 (Myc<sup>-/-</sup>). Επιπλέον, όπως αποκαλύφθηκε από τη μελέτη, το Myscro3 εμφάνισε ικανοποιητική φαρμακοκινητική με μέγιστη συγκέντρωση στο αίμα 0,8  $\mu\text{M}$  τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση του σε ποντικούς. Επιπλέον, διατηρήθηκε στην κυκλοφορία τους για τουλάχιστον 12 ώρες σε συγκεντρώσεις επαρκείς για μελέτες αποτελεσματικότητας (0,5  $\mu\text{M}$ ). Βρέθηκε επίσης ότι, παρότι αδιάλυτο στο νερό, μπορεί να χορηγηθεί στα πειραματικά μοντέλα με στοματικό καθετήρα ως γαλάκτωμα.

Προκειμένου να ελεγχθεί η *in vivo* δραστηριότητα της ένωσης έναντι του ετεροδιμερούς Myc-Max, χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα ποντικών Pdx1-cre/KRAS\* (που χρησιμοποιούνται για τη μοντελοποίηση αδενοκαρκινώματος παγκρεατικού πόρου). Η χορήγηση Myscro3 σε δόση 100 mg/kg για δύο μήνες αύξησε σημαντικά το χρόνο ζωής των ποντικών (σχεδόν κατά ένα μήνα) ενώ δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις από τη λήψη του φαρμάκου. Η αποτελεσματικότητα του Myscro3 αποδείχθηκε περαιτέρω, από τη συρρίκνωση των όγκων μετά τη λήψη της θεραπείας σε σχέση με τα δείγματα control. Επιπλέον, η χρήση αντισωμάτων έναντι του Ki-67 και της caspase-3 έδειξε, αντίστοιχα, μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αύξηση της απόπτωσης. Τέλος, η επαλήθευση ότι το Myscro3 λειτουργεί μέσω της αναστολής Myc στη θεραπεία του PDA λήφθηκε μέσω της σύγκρισης των μεταγραφικών προφίλ των μη επεξεργασμένων (control) και των πρωτογενών καλλιέργειών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με Myscro3. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε πως το προφίλ των γονιδίων που ρυθμίστηκαν προς τα κάτω σε κύτταρα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με Myscro3 εμφάνισε σημαντικό βαθμό επικάλυψης με γονίδια που επίσης ρυθμίζονται προς τα κάτω από τον αναστολέα Otopmyc, με γονίδια που κανονικά ρυθμίζονται προς τα πάνω από τη Myc αλλά και με γονίδια που είναι γνωστοί άμεσοι στόχοι της Myc (Stellas et al., 2014). Όλα τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν πως η ένωση Myscro3 είναι ένας ισχυρός Myc αναστολέας τουλάχιστον σε προκλινικό επίπεδο και αποτελούν εφελκυστικό για τον σχεδιασμό κλινικών μελετών αλλά και νέων ενώσεων με βάση τη δομή του συγκεκριμένου anti-Myc παράγοντα.

Η ένωση KJ-Pyr-9, ταυτοποιήθηκε από τους Hart et al. (2014) σε μια συνδυαστική βιβλιοθήκη πυριδίνης 220 ενώσεων του Kröhnke που ελέγχθηκε μέσω πόλωσης φθορισμού για την αναστολή του διμερισμού Myc-Max. Από πειράματα συμβολομετρίας οπισθοσκέδασης (BSI) αποδείχθηκε πως ο αναστολέας KJ-Pyr-9 συνδέεται απευθείας με το αδόμενο Myc με  $K_D=6,5$  nM καθώς και με το ετεροδιμερές Myc-Max (13,4 nM) που διαχωρίζει, ενώ η αλληλεπίδραση του με το ομοδιμερές Max ήταν ασθενής (> 1  $\mu\text{M}$ ). Παρά τη χαμηλή του διαλυτότητα, ο KJ-Pyr-9 είναι διαπερατός από κύτταρα και διαταράσσει τον σχηματισμό του συμπλόκου Myc-Max, ενώ έχει τη δυνατότητα να διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) υποδεικνύοντας μια πιθανή χρήση στη θεραπεία όγκων εγκεφάλου. Επιπλέον, ο KJ-Pyr-9 δοκιμάστηκε *in vivo* ενάντια σε μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού μιας εξαιρετικά επιθετικής, διηθητικής ανθρώπινης κυτταρικής σειράς τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC), MDA-MB-231, όπου η χορήγηση του με ενδοπεριτοναϊκή ένεση, σταμάτησε την ανάπτυξη του όγκου μέσω της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας της MYC (Hart et al., 2014).

Σε μια από τις πιο πρόσφατες αναφορές, οι Castell et al. (2018) με στόχο τη στόχευση του Myc-Max αναγνώρισαν έναν νέο αναστολέα μικρού μορίου, τον MYCMI-6 (NSC354961), από μια βιβλιοθήκη 1990 ενώσεων του NCI/DTP Open Chemical Repository. Η ένωση MYCMI-6 όπως αποδείχθηκε με τις δοκιμασίες συμπλήρωσης θραύσματος λουσιφεράσης Gaussia (GLuc) και isPLA (in situ Proximity Ligation Assay) σε ανθρώπινες κυτταρικές γραμμές, επιδεικνύει ισχυρή και εκλεκτική ανασταλτική δράση τόσο στο ετεροδιμερές C-Myc-Max όσο και στο ετεροδιμερές N-Myc-Max σε μονοψήφιες μικρομοριακές συγκεντρώσεις ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις Max-Max, Mxd1-Max και παρόμοιων πρωτεϊνών bZip όπως οι Jun/Fos. Το MYCMI-6 όπως αποκαλύπτεται με πειράματα MST και SPR συνδέεται με το Myc ενώ η σύνδεση του με το Max ή άλλες παρόμοιες πρωτεΐνες όπως Mxd1, P53, BSA είναι αμελητέα. Το MYCMI-6 επέδειξε επίσης ισχυρή και εκλεκτική δράση σε κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και λεμφώματος Burkitt χωρίς να εμφανίζει κυτταροτοξικότητα στους πρωτογενείς φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες σε συγκεντρώσεις που εξάλειψαν σχεδόν το 100% των εξαρτώμενων από MYC κυττάρων των παραπάνω καρκινικών σειρών. Τέλος, το MYCMI-6 δοκιμάστηκε και in vivo σε μοντέλο όγκου ξеноμοσχεύματος ποντικού σε κύτταρα νευροβλαστώματος SK-N-DZ που έχουν ενισχυθεί με N-Myc, προκαλώντας μαζική απόπτωση και μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την πυκνότητα μικροαγγείωσης του όγκου μέσω της αποσταθεροποίησης της αλληλεπιδράσης N-Myc-Max χωρίς ταυτόχρονα την πρόκληση σοβαρών παρενεργειών στα ζωικά μοντέλα (προσδιορίστηκαν μόνο κάποιες μικρές και παροδικές επιδράσεις στο σωματικό τους βάρος) (Castell et al., 2018). Το MYCMI-7 που ταυτοποιήθηκε επίσης μέσω HTS από την ίδια ομάδα, αποδείχθηκε ότι δεσμεύει άμεσα το c-MYC/ N-MYC, προκαλώντας απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Σε δοκιμασίες in vivo σε μοντέλα ποντικών οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, καρκίνου μαστού και καρκίνου νευροβλαστώματος μείωσε την έκφραση Myc/N-Myc, προκάλεσε μαζική απόπτωση και μειωμένο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και μείωσε τη μικροαγγείωση σε συμπαγής όγκους. Αξίζει να σημειωθεί πως στη βιβλιογραφία για τους αναστολείς Myc-Max που έχουν αναπτυχθεί, μόνο για τους MYCMI-6, MYCMI-7, 10058-F4, KJ-Pyr-9, KSI-3716, Mycro3, MYCi361 και MYCi975 έχει αναφερθεί πως αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων σε μοντέλα όγκων ποντικού. Σε αυτές τις μελέτες, τα MYCMI-6, MYCMI-7 και το Mycro3 αποδείχθηκε ότι μειώνουν τη δραστηριότητα ή την έκφραση του MYC στον ιστό του όγκου ενώ η χορήγηση τους δεν επιφέρει σοβαρές παρενέργειες στο ζωικό μοντέλο. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό που επισημαίνεται σε αυτό το σύνολο μελετών είναι η ανασταλτική δραστηριότητα pan-MYC των MYCMI-6 και -7 που αφορούν τόσο το c-MYC όσο και το N-MYC. Ενώ το c-MYC είναι ο κύριος θεραπευτικός στόχος μεταξύ της οικογένειας των ογκοπρωτεϊνών c-MYC, N-MYC και L-MYC, τα δύο τελευταία μέλη έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη νευροβλαστώματος και καρκίνου του πνεύμονα αντίστοιχα. Με βάση την αλληλουχία και τη δομική ομοιότητα μεταξύ των πρωτεϊνών MYC, η ανάπτυξη κλινικά βιώσιμων αναστολέων pan-MYC φαίνεται να είναι εφικτή (Castell et al., 2022).



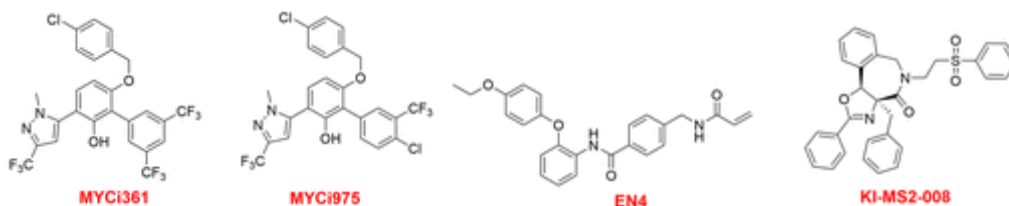
**Εικόνα 16:** Δομές των αναστολέων Mycro3, MYCMI-6 & -7 και KJ-Pyr-9. (Karadkhelkar et al., 2023).

Ένας νέος Myc-αναστολέας ο MYCi361 προσδιορίστηκε με in silico διαλογή μιας μεγάλης χημικής βιβλιοθήκης που επεξεργάστηκε με το φίλτρο Pan Assay Interference Components (PAINS) για την αφαίρεση δυνητικά τοξικών ή μεταβολικά ασταθών ομάδων και μορίων που

δεν μοιάζουν με φάρμακα από τη βάση δεδομένων ZINC που περιέχει 35 εκατομμύρια ενώσεις. Η *in silico* διαλογή ακολουθήθηκε από *in vitro* διαλογή για την αξιολόγηση της διακοπής του σχηματισμού συμπλόκου MYC/MAX/DNA (μέσω Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) και *in vivo* διαλογή σε ένα μοντέλο αλομοσχεύματος ποντικού καρκίνου του προστάτη Myc-CaP για την αξιολόγηση της μεταγραφικής δραστηριότητας MYC στα μοσχεύματα όγκου μετά από θεραπεία με την εκάστοτε ένωση. Μέσω ενός συνόλου πειραμάτων κυτταρικής θερμικής μετατόπισης (CETSA), συν-ανοσοκαθίζησης (co-IP) και απολίνωσης εγγύτητας (PLA) σε κύτταρα PC3 αποδείχθηκε πως το Myc361 συνδέεται με τη Myc και διαταράσσει το σχηματισμό του συμπλόκου Myc-Max. Επιπλέον, η θεραπεία με Myc361 μείωσε τα επίπεδα πρωτεΐνης MYC και MYCN, αλλά όχι MAX σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές δίχως να μεταβάλλει τα επίπεδα Myc-mRNA γεγονός που συνάδει με την παρατήρηση πως το Myc361 αυξάνει επιλεκτικά τη φωσφορυλίωση της T58 έναντι της S62 της Myc. Φαίνεται πως ο Myc361 διαταράσσει το σχηματισμό του συμπλόκου Myc-Max και ταυτόχρονα προωθεί τη φωσφορυλίωση της T58 της επάγοντας την αποικοδόμηση της. Ο Myc361 δοκιμάστηκε σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη (MycCaP, LNCaP, PC3), της λευχαιμίας (MV4-11), του λεμφώματος (HL-60, P493-6) και του νευροβλαστώματος (SK-N-B2) όπου ανέστειλε τη βιωσιμότητα και την ογκογένεση των καρκινικών κυττάρων που εξαρτώνται από το MYC σε χαμηλά μικρομοριακά IC50s ενώ παρουσίασε μικρή επίδραση σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος (PC12), τα οποία δεν απαιτούν διμερές MYC/MAX για πολλαπλασιασμό τους. Η θεραπεία με MYC361 των ποντικών με ξενομόσχευμα MYC-CaP έδειξε αύξηση στα επίπεδα MYC pT58 και μείωση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 στον ιστό του όγκου μαζί με αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν σε μελέτες συνδυασμού του MYC361 και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (anti-PDL) που κατέδειξαν την πιθανή συνεργιστική δράση της συνδυαστικής θεραπείας και τη χαμηλή τοξικότητα στα ζωικά μοντέλα ξενομοσχεύματος. Ωστόσο εκτενέστερες μελέτες σε ζώα που λάμβαναν θεραπεία με Myc361 έδειξαν ότι μπορεί να μην είναι καλά ανεκτή για παρατεταμένες περιόδους, σε δόσεις που είναι απαραίτητες για την αποτελεσματικότητα μη συνδυαστικής θεραπείας.

Η τοξικότητα του MYC361 ώθησε την ανάπτυξη ενός νέου αναλόγου του MYC975. Ο MYC975 επέδειξε ευνοϊκή φαρμακοκινητική και *in vivo* αποτελεσματικότητα διαταράσσοντας το ετεροδιμερές MYC/MAX και προάγοντας τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 58 ακολουθούμενη από αποικοδόμηση του MYC σε μοντέλα ποντικών Myc-CaP, καρκίνου του πνεύμονα Lewis (LLC1) και σε μοντέλα ξενομοσχεύματος AML MV-411 με ανοσοανεπάρκεια (NGS). Ωστόσο, η αντικαρκινική δράση του Myc975 φαίνεται να ενισχύεται μέσω συνδυαστικής θεραπείας με το αντίσωμα PD-L1 στη περίπτωση του μοντέλου Myc-CaP ή την Ara-C στο μοντέλο AML MV-411 (Han et al., 2019).

Μια διαφορετική προσέγγιση στόχευσης επεδίωξε την ομοιοπολική σύνδεση ενός μικρού μορίου σε υπολείμματα κυστεΐνης της πρωτεΐνης c-MYC. Ο αναστολέας EN4 που ανακαλύφθηκε μέσω screening ομοιοπολικού συνδέτη που αντιδρά με κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης Myc. Ο EN4 δείχθηκε πως συνδέεται ομοιοπολικά με την κυστεΐνη 171 του c-MYC. Ο EN4 μπορεί να αναστείλει τη δέσμευση του MYC-MAX στο DNA και μειώσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλα καρκίνου του μαστού 231 MFB CDX. Παρά τις ανησυχίες σχετικά με την εκλεκτικότητα, ο EN4 μπορεί να προσφέρει μια νέα οδό προς τη θεραπεία καρκίνων που προκαλούνται από MYC λόγω της ομοιοπολικής φύσης της αλληλεπίδρασης του με την c-MYC (Karadkhelkar et al., 2023).



**Εικόνα 17:** Δομές των αναστολέων Myci361 & 975, EN4 και KI-MS2-008 (Karadkhelkar et al., 2023).

Τέλος, μια εναλλακτική προσέγγιση που αξίζει ιδιαίτερη αναφορά είναι η διατάραξη της μεταγραφικής δραστηριότητας του MYC μέσω της στόχευσης του εταίρου δέσμησης MAX. Το μόριο KI-MS2-008 αποδείχθηκε ότι σταθεροποιεί μεταγραφικά αδρανή ομοδιμερή MAX-MAX, με αποτέλεσμα τη μείωση τόσο της δέσμησης MYC στους προαγωγείς των γονιδίων στόχων όσο και στα επίπεδα της πρωτεΐνης MYC σε κύτταρα P493-6. Το KI-MS2-008 επέδειξε αξιοσημείωτη in vivo αποτελεσματικότητα σε χαμηλές δόσεις μειώνοντας σημαντικά το φορτίο του όγκου σε μοντέλα αλλομοσχευμάτων ποντικών T-ALL (λεμφοβλαστικής λευχαιμίας T-λεμφοκυττάρων) και HCC (ηπατοκυτταρικού καρκινώματος), αν και αυτή η μελέτη δεν αξιολόγησε την επίδραση του KI-MS2-008 σε ανοσοανθεκτικά μοντέλα (Struntz et al., 2019).

### **1.9 Παρεμβολή στον ετεροδιμερισμό Myc-Max μέσω mini-πρωτεϊνών : Η περίπτωση του OMO MYC.**

Το Ototomyc είναι μια πρωτεΐνη 92 αμινοξέων που διαθέτει το μοτίβο bHLHLZ της Myc αλλά σε αντίθεση με τη μητρική πρωτεΐνη, είναι σε θέση να ομοδιμερίζεται. Αυτό οφείλεται στην εισαγωγή τεσσάρων μονοσημειακών μεταλλάξεων στην περιοχή διμερισμού που αντιστοιχούν στα τέσσερα φορτισμένα αμινοξέα που φαίνεται ότι αποτρέπουν τον ομοδιμερισμό Myc λόγω ισχυρών στερικών και ηλεκτροστατικών παρεμποδίσεων. Στη δομή του Ototomyc το ζεύγος Arg423-Arg424 ( που παρεμποδίζει τον ομοδιμερισμό Myc) αντικαθίσταται από Gln και Asn (R77Q και R78N). Επίσης, το ζεύγος Glu410 (E410)- Glu417(E417) (που ασκεί αποσταθεροποιητική επίδραση στον Myc ομοδιμερισμό) αντικαθίσταται με Thr και Ile (E57T, E64I) (**Εικόνα 18**). Το Ototomyc σύμφωνα με πειράματα ανοσοκαθίζησης χρωματίνης, απολίνωσης εγγύτητας και ανοσοκαθίζησης διπλής χρωματίνης (ReChIP), είναι σε θέση να σχηματίζει τόσο ομοδιμερή όσο και ετεροδιμερή με τη Myc και τη Max.

Η περιοχή bHLHLZ του Ototomyc προσφέρει έναν μοναδικό μηχανισμό αναστολής που συνδυάζει τέσσερεις διαφορετικούς τρόπους υποβάθμισης :

i) Το Ototomyc σχηματίζει ετεροδιμερή με τη Myc, αποτρέποντας τον ετεροδιμερισμό της με τη Max και απομονώνοντας την παράλληλα από το DNA, αφού τα ετεροδιμερή Ototomyc-Myc αδυνατούν να δεσμεύσουν E-box.

ii) Το Ototomyc δεσμεύεται στη Max, αποτρέποντας τον ετεροδιμερισμό της με τη Myc, ενώ τα ετεροδιμερή Ototomyc-Max ανταγωνίζονται τα ετεροδιμερή Myc-Max για τη δέσμευση E-box.

iii) Το ομοδιμερές Ototomyc ανταγωνίζεται το ετεροδιμερές Myc-Max για τη δέσμευση κοινών E-box στο DNA.

iv) Το Ototomyc επάγει έμμεσα την πρωτεασωμική αποικοδόμηση της Myc. Αυτή η τελευταία λειτουργία φαίνεται να είναι συνέπεια του πρώτου μηχανισμού δράσης, καθώς το Ototomyc

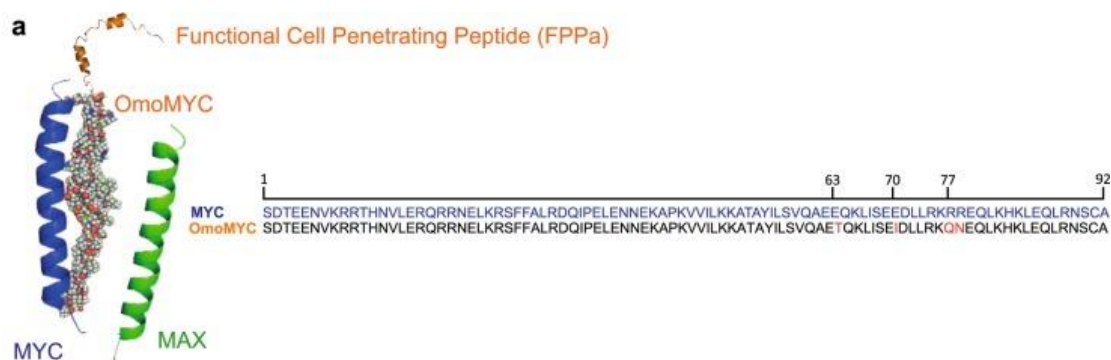
αποτρέπει τον ετεροδιμερισμό της *Myc* με τη *Max*, υποχρεώνοντας την να αποσυντεθεί (Ellenbroek et al., 2024; Soucek et al., 1998).

Τα πεπτιδία και οι πρωτεΐνες δεν θεωρούνται τυπικά ως υποψήφια φάρμακα επειδή το μεγάλο μοριακό τους μέγεθος και μερικές φορές η υδρόφιλη φύση τους μειώνουν την ικανότητα διείσδυσής τους στις βιολογικές μεμβράνες. Συνακόλουθα, η χρήση του *Otomyc* ως φάρμακο, δημιουργούσε αρχικά σοβαρές ανησυχίες σχετικά με το μεταβολισμό και τη διεισδυτική του ικανότητα σε κακοήγη ανθρώπινα κύτταρα.

Μια νέα μελέτη, που διεξήχθη για να αξιολογήσει τη διεισδυτική ικανότητα του πεπτιδίου *Otomyc* και την καταλληλότητά του για περαιτέρω φαρμακευτική ανάπτυξη, ανέτρεψε τις παραπάνω υποθέσεις. Με βάση τα αποτελέσματά της μελέτης αυτής, η καθαρισμένη μίνι-πρωτεΐνη *Otomyc* εμφανίζει απροσδόκητες ιδιότητες διείσδυσης σε κύτταρα, εμποδίζοντας τη μεταγραφική λειτουργία της *MYC* σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα μοντέλων ανθρώπου και ποντικού.

Συγκεκριμένα, η θεραπεία των κυτταρικών σειρών NSCLC (μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις *Otomyc* από 390 nM σε 50 μM οδήγησε σε προοδευτικά αυξανόμενη απόπτωση με IC50s από 6,2 έως 13,6 μM. Επιπλέον, το *Otomyc* εμφάνισε αξιοσημείωτη *in vivo* αποτελεσματικότητα σε μοντέλο ποντικού αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα που βασίζεται σε *KRas*<sup>G12D</sup>. Η θεραπεία με ενδορινική χορήγηση του *Otomyc* (2,37 mg/kg) για 4 εβδομάδες, μείωσε σημαντικά το φορτίο του όγκου, γεγονός που διαφάνεται από τη διακοπή της εξέλιξης των όγκων των ποντικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία σε σχέση με τα μοντέλα ελέγχου όπου το μέγεθος των όγκων υπεδιπλασιάστηκε. Τα παραπάνω αποτελέσματα υπογραμμίζουν τόσο τις αντιπολλαπλασιαστικές όσο και τις προαποπτωτικές επιδράσεις του πεπτιδίου *Otomyc*. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως η χορήγηση του ανηθητικού πεπτιδίου δεν συσχετίστηκε με επιβλαβείς παρενέργειες ή απώλεια βάρους κατά τη διάρκεια της θεραπείας 28 ημερών (Beaulieu et al., 2019).

Σε ένα δεύτερο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο ποντικού που έφερε αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα με μετάλλαξη στον EGFR, προκειμένου να συγκριθεί η δράση του *Otomyc* σε σχέση με τη πακλιταξέλη (παράγοντας στόχευσης τουμπουλίνης) αλλά και σε σχέση με τη συνδυαστική θεραπεία. Όπως αποκαλύφθηκε, η ενδοφλέβια χορήγηση του *Otomyc* στο συγκεκριμένο μοντέλο επέδειξε ενισχυμένη δραστηριότητα σε σχέση με την πακλιταξέλη. Ωστόσο, η συνδυαστική θεραπεία του *Otomyc* με την πακλιταξέλη αποδείχθηκε κατά πολύ ανώτερη και των δύο αυτόνομων θεραπειών, αφού σχεδόν ακύρωσε την ανάπτυξη του όγκου, προάγοντας την παρατεταμένη επιβίωση των ζωικών μοντέλων (Beaulieu et al., 2019).



**Εικόνα 18:** Σχηματική αναπαράσταση ετεροδιμερούς *Myc*-FPPa-*Otomyc*. Παρουσιάζεται επίσης η αμινοξική αλληλουχία του *Otomyc* σε σύγκριση με την αντίστοιχη αλληλουχία της πρωτεΐνης *Myc*. Οι σημειακές μεταλλάξεις του *Otomyc*, σημαίνονται με πορτοκαλί χρωματισμό (E. Wang et al., 2019).

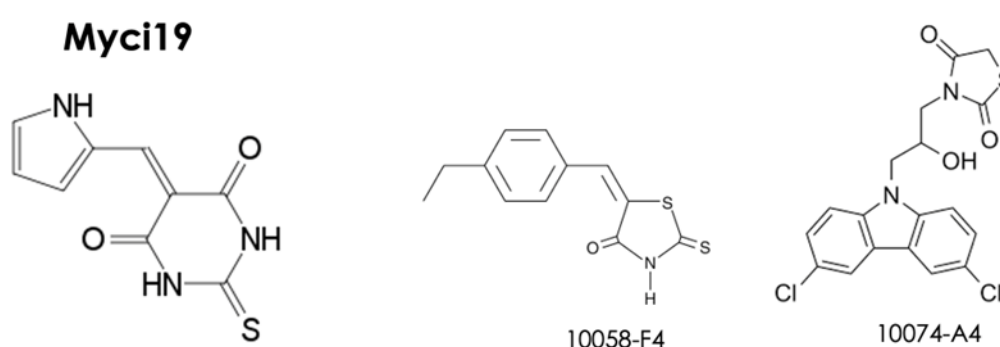
Προκειμένου να αυξηθεί η *in vivo* ικανότητα διείσδυσης σε καρκινικά κύτταρα, το πεπτιδίο συνδυάστηκε με ένα N-τερματικό, λειτουργικό, διεισδυτικό, φυλλομερές (FPPa) (Εικόνα 16). Το FPPa-Otomyc εμφάνισε αυξημένη ικανότητα διείσδυσης σε κυτταρικές σειρές TNBC, επιδεικνύοντας ισχυρή αντικαρκινική δράση με IC 50 ~1 μM (E. Wang et al., 2019). Η διεισδυτική ικανότητα αλλά και η ισχυρή δραστηριότητα του FPP-Otomyc επιβεβαιώθηκαν και σε *in vivo* μοντέλα αλομοσχεύματος TNBC (T11) όπου το FPPa-Otomyc -αλλά όχι το Otomyc ή το FPPa – ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό του όγκου προκαλώντας παράλληλα αυξημένη απόπτωση. Και σε αυτή τη περίπτωση η συνδυαστική θεραπεία FPPa-Otomyc με χημικοθεραπευτικά (όπως docetaxel, doxorubicin και cetuximab) αποδεικνύεται ανώτερη των μεμονωμένων θεραπειών αφού ενισχύει το κυτταροτοξικό δυναμικό, μειώνει τις υψηλές απαιτήσεις δοσολογίας φαρμάκου για τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων και ελαχιστοποιεί τις παρενέργειες (E. Wang et al., 2019).

Παρά τα όποια αποθαρρυντικά σενάρια σχετικά με τη διεισδυτικότητα του Otomyc, η πρώτη επιτυχημένη κλινική δοκιμή φάσης 1, επικύρωσε την ασφάλεια και την ανεκτικότητα του πεπτιδίου σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. Η μελέτη έδειξε ενθαρρυντικά σημάδια δραστηριότητας του φαρμάκου που βασίζονται τόσο στην κλινική ανταπόκριση όσο και στην αξιολόγηση βιοδεικτών απόκρισης. Από τους 22 ασθενείς που επιλέχθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης, οι 12 έφτασαν στο προκαθορισμένο χρονικό σημείο των 9 εβδομάδων για την αξιολόγηση της αντινεοπλασματικής δράσης του φαρμάκου. Από αυτούς, σε 8 - δύο με αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου, (PDAC), τρεις με καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), ένας με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC), ένας με φουσκοκυτταρικό σάρκωμα (SARC) και ένας με καρκίνωμα σιελογόνων αδένων (SGC)- η νόσος σταθεροποιήθηκε μετά την θεραπεία με Otomyc ενώ σε έναν ασθενή με PDAC, το συνολικό φορτίο του όγκου μειώθηκε κατά 49%. Παράλληλα, η παρηγορητική θεραπεία με Otomyc σε ασθενή με SGC, διατήρησε τη νόσο σταθερή για 26 μήνες χωρίς καμία παρενέργεια. Αξίζει να σημειωθεί πως οι ασθενείς που εμφάνισαν σταθεροποίηση της νόσου παρουσίασαν παροδικά αυξημένα επίπεδα παραγόντων -IFN $\gamma$ , CD62E και IL-17A- που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και διαθέτουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες (Garralda et al., 2024).

### 1.10 Ενώσεις που θα αξιολογηθούν στο πλαίσιο της διπλωματικής

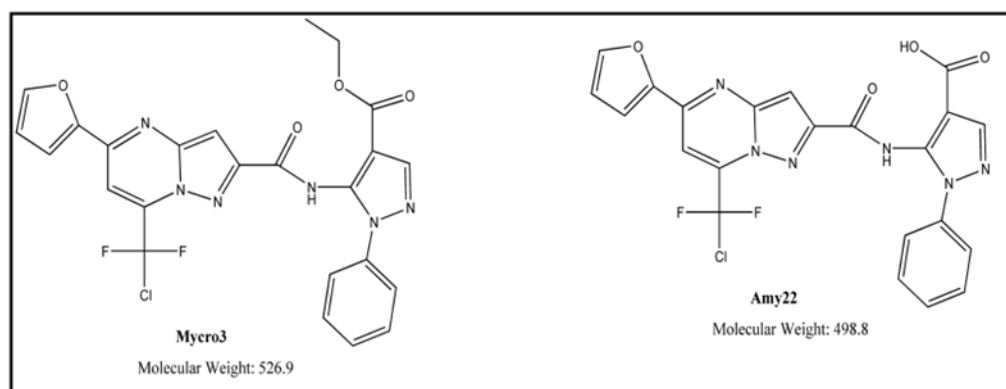
Οι ενώσεις που θα αξιολογηθούν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής προέρχονται από δύο κατηγορίες μορίων-οδηγών : της ένωσης Myci19 και της ένωσης Amy22.

Μια από τις συνεργαζόμενες ομάδες του Πανεπιστημίου Αθηνών επέλεξε ως ένωση-οδηγό τη Myci19 που αποτελεί ανάλογο των αναστολέων 10058-F4 και 10074-A4. Με βάση τη δομή του Myci19 επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση αναλόγων από τη χημική αποθήκη NCI μέσω υπολογισμών φάρμακο-ομοιότητας για την πρόβλεψη βελτιστοποιημένων δομών σε σχέση με την ένωση-οδηγό. Μετά την ολοκλήρωση της διαλογής των αναλόγων ενώσεων, ακολούθησε η σύνθεση τους. Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν να αξιολογηθούν στο πλαίσιο της διπλωματικής είναι οι Myci53, Myci57 και Myci69. Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε και ένα παλαιότερο ανάλογο της ίδιας σειράς που ονομάζεται Myci23S.



**Εικόνα 19:** Δομή των ένωσης Myci19 που αποτελεί ανάλογο των αναστολέων 10058-F4 και 10074-A4.

Η δεύτερη κατηγορία ενώσεων που θα μελετηθεί στο πλαίσιο της διπλωματικής αποτελούν ανάλογα της ένωσης Amy22, κύριου μεταβολίτη του γνωστού αναστολέα Mycro3. Ο σχεδιασμός των αναλόγων σε αυτή τη περίπτωση βασίστηκε σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής που στηρίχθηκαν στο μοντέλο free energy landscape. Τόσο ο σχεδιασμός των αναλόγων ενώσεων όσο και η σύνθεσή τους έγιναν από συνεργαζόμενες ομάδες του BRFAA και του Πανεπιστημίου Αθηνών. Από τα ανάλογα επιλέχθηκαν οι ενώσεις T226-1216, DP-01941, KM-01958, JPV-00088, SCR00630, PB324795808 που επρόκειτο να αξιολογηθούν, παρακάτω.



**Εικόνα 20:** Δομή των ένωσης Amy22 που αποτελεί κύριο μεταβολίτη του αναστολέα Mycro3.



## 1.11 Βιοφυσικές τεχνικές χαρακτηρισμού της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-φαρμάκου

### 1.11.1 Φθορισμομετρία

Ο φθορισμός είναι ένα βραχύβιο φαινόμενο που συμβαίνει κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίου από μια απλή διεγερμένη κατάσταση στη θεμελιώδη, με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας, σε χρόνους που κυμαίνονται από  $10^{-5}$  έως  $10^{-10}$  sec μετά την διέγερση. Το φαινόμενο αυτό είναι πολύ ευαίσθητο και επηρεάζεται από μια πληθώρα παραγόντων όπως το pH, τη θερμοκρασία, το διαλύτη, τη δομή και τη δομική ακαμψία του μορίου, τη συγκέντρωση του φθορίζοντος μορίου. Συνεπώς, οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να επιλέγονται προσεκτικά διότι μικρές αλλαγές σε καθένα από τους παραπάνω παράγοντες ή ακόμη στα επιμέρους συστατικά του διαλύματος μεταβάλλουν τόσο το μήκος κύματος όσο και την ένταση του φθορισμού οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Η εγγενής ευαισθησία του φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της δέσμευσης συνδετών σε βιομόρια. Στη περίπτωση της Myc αυτό καθίσταται δυνατό λόγω της ύπαρξης ενός αρωματικού καταλοίπου Tyr στη περιοχή bHLHZ που της προσδίδει εγγενή φθορισμό. Συνεπώς, μια κατάλληλη μέθοδος για την αξιολόγηση της δεσμευτικής ικανότητας των συνθετικών ενώσεων ως προς την υπό μελέτη πρωτεΐνη, είναι η απόσβεση φθορισμού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει τη μέτρηση του φθορισμού σε δείγματα που περιέχουν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ενός αποσβέστη (εν προκειμένο το αξιολογούμενο φάρμακο). Καθώς, η συγκέντρωση του αποσβέστη αυξάνει, αναμένεται ο εγγενής φθορισμός της πρωτεΐνης να μειώνεται εφόσον υφίσταται αλληλεπίδραση. Η απόσβεση φθορισμού εκτός της ποιοτικής αξιολόγησης της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-συνδέτη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την εξαγωγή ποσοτικών αποτελεσμάτων μέσω της εύρεσης του  $K_d$  του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέματος (Lakowicz et al., 1999).

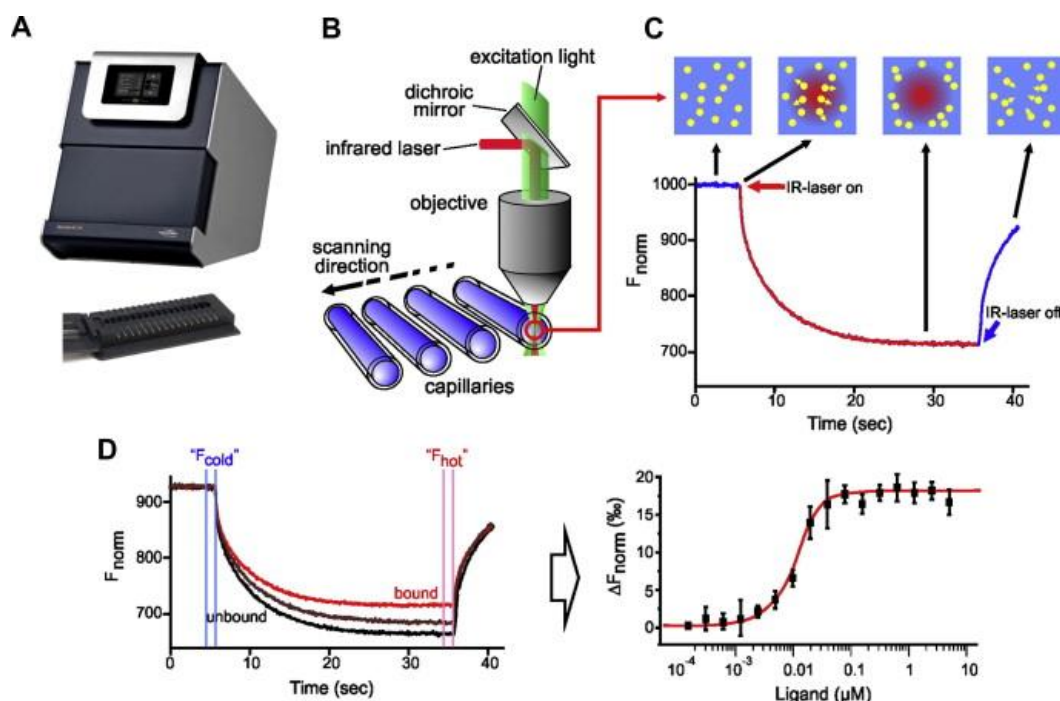
### 1.11.2 Θερμοφόρηση μικροκλίμακας

Η θερμοφόρηση σε μικροκλίμακα (*Microscale Thermophoresis, MST*) είναι μια πλήρως οπτική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων των βιομορίων. Βασίζεται στην αρχή της θερμοφόρησης που είναι η κατευθυνόμενη κίνηση των μορίων σε μια διαβάθμιση θερμοκρασίας. Η θερμοφόρηση προκαλείται και ανιχνεύεται σε μικρά γυάλινα τριχοειδή που περιέχουν ένα διάλυμα φθορίζοντων μορίων. Ένα υπέρυθρο (IR) λέιζερ με μήκος κύματος εκπομπής 1480 nm εστιάζεται μέσω ενός διχρωϊκού φακού στο τριχοειδές για να παράξει μια μικροσκοπική κλίση θερμοκρασίας που εκτείνεται από 2-6 °C με διάμετρο ~50  $\mu\text{m}$ . Στη φωτεινή διαδρομή εστιάζεται επίσης το ορατό φως που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του φθοροφόρου. Το ορατό φως που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του φθοροφόρου ( από το όργανο Monolith NT.115 MST ) εξέρχεται από ένα κόκκινο φίλτρο LED (διέγερση 600–650 nm, εκπομπή 650–725 nm).

Το ίχνος χρόνου - φθορισμού (*MST trace*) που ανιχνεύεται στη διάρκεια της θερμοφόρησης, εμφανίζει μια σειρά από καθορισμένες και διαδοχικές φάσεις. Πριν τη θέρμανση, ο αρχικός φθορισμός ( $F_{\text{cold}}$ ) καταγράφεται και θα πρέπει να είναι σταθερός σε όλα τα δείγματα. Η ενεργοποίηση του λέιζερ IR οδηγεί σε απότομη αλλαγή της έντασης του φθορισμού, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *T-jump* και αντιστοιχεί στην εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία μεταβολή του φθορισμού που αποτελεί εγγενής ιδιότητα του φθοροφόρου. Το *T-jump* διαρκεί περίπου 100 ms και ακολουθεί μια σχετικά αργή φάση θερμοφόρησης (*slow thermophoresis*). Η ένταση του φθορισμού φτάνει σε μια κατώτατη περιοχή (όπου καταγράφεται ο τελικός φθορισμός  $F_{\text{hot}}$ ) που αντιπροσωπεύει τη κατάσταση στην οποία η θερμοδιάχυση αντισταθμίζεται από τη διάχυση μάζας. Αμέσως μετά την απενεργοποίηση του λέιζερ θέρμανσης (IR off), γίνεται ανάκτηση του φθορισμού λόγω της εξάρτησης του φθοροφόρου από τη θερμοκρασία, το σημείο



αυτό είναι το αντίστροφο T-jump. Η τελική φάση ονομάζεται backdiffusion, όπου η κίνηση των μορίων καθοδηγείται από καθαρή διάχυση μάζας και οδηγεί στην αντιστάθμιση της βαθμίδας συγκέντρωσης που δημιουργήθηκε (Εικόνα 21).



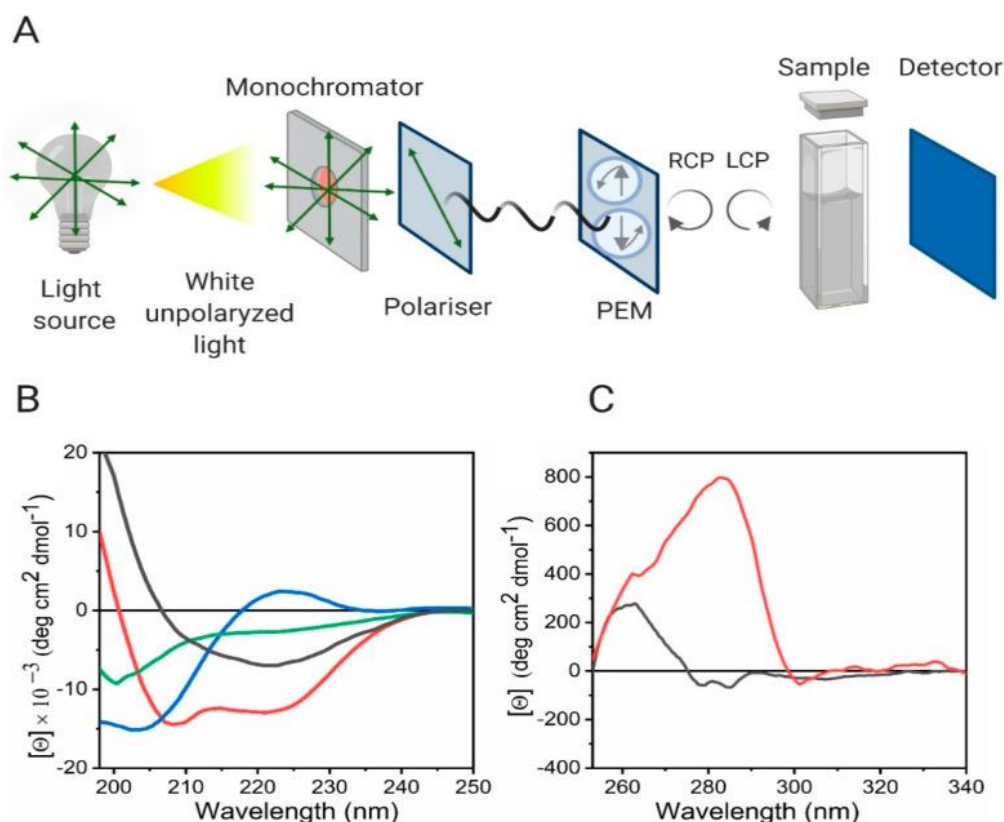
**Εικόνα 21:** (A) Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου Monolith NT.115 MST. (B) Σχηματική αναπαράσταση των οπτικών του οργάνου και των γυάλινων τριχοειδών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση. (C) Τυπικό σήμα MST. Ο αρχικά σταθερός φθορισμός μειώνεται (T-jump) με την ενεργοποίηση του laser. Ακολουθεί μια σχετικά αργή φάση θερμοφόρησης που καταλήγει σε μια κατώτατη περιοχή. Στο σημείο αυτό το laser απενεργοποιείται και ο φθορισμός αυξάνει (αντίστροφο T-jump). Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από κίνηση των μορίων καθοδηγείται από καθαρή διάχυση μάζας προκειμένου να αντισταθμιστεί η βαθμίδα συγκέντρωσης που δημιουργήθηκε από τη θερμοφόρηση. (D) Τυπικό πείραμα δέσμευσης. Η θερμοφορητική κίνηση ενός φθορίζοντος μορίου (μαύρο ίχνος, «αδέσμευτο») αλλάζει κατά τη δέσμευση σε έναν μη φθορίζοντα συνδετήρα (κόκκινο ίχνος, «δεσμευμένο»), με αποτέλεσμα τη καταγραφή διαφορετικών ίχνών. Για την ανάλυση της δέσμευσης, χρησιμοποιείται ο κανονικοποιημένος φθορισμός ( $\Delta F_{norm}$ ), ο οποίος ορίζεται ως  $F_{hot}/F_{cold}$  (οι τιμές  $F$  αντιστοιχούν σε μέσες τιμές φθορισμού μεταξύ καθορισμένων περιοχών που σημειώνονται από τον κόκκινο και τον μπλε δρομέα, αντίστοιχα). Η ποσοτική ανάλυση της σύνδεσης ενός υποκαταστάτη σε μια πρωτεΐνη μπορεί να γίνει με τιτλοδότηση του μη φθορίζοντος υποκαταστάτη. Οι αλλαγές στα ίχνη θερμοφόρησης που προκύπτουν λόγω της δέσμευσης του προσδέματος στο φθορίζον μόριο χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία μια καμπύλης κανονικοποιημένου φθορισμού – συγκέντρωσης υποκαταστάτη. Με βάση τη καμπύλη αυτή μπορεί να εξαχθεί η σταθερά δέσμευσης του προσδέματος στο πρωτεϊνικό μόριο (Jerabek-Willemsen et al., 2014).

Μέσω του MST είναι δυνατή η λήψη ποιοτικών πληροφοριών για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-συνδέτη μέσω του Binding test (αναλύεται παρακάτω), αλλά και η λήψη ποσοτικών αποτελεσμάτων μέσω του Binding Affinity test (αναλύεται παρακάτω) για την εξαγωγή σταθερών δέσμευσης (Jerabek-Willemsen et al., 2014).

### 1.11.3 Κυκλικός Διχρωσμός (CD)

Ο κυκλικός διχρωσμός αποτελεί μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της διαμόρφωσης και της σταθερότητας των πρωτεϊνών σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και η παρουσία διαλυμένων ουσιών ή μικρών μορίων. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη διαφορετική απορρόφηση του αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένου φωτός από οπτικές ενεργά κέντρα.

Οργανολογικά μια πηγή φωτός εκπέμπει φωτεινή ακτινοβολία η οποία διέρχεται από έναν μονοχρωμάτορα που μετατρέπει το εκπεμπόμενο λευκό φως σε γραμμικό. Το γραμμικό φως στη συνέχεια διέρχεται από έναν polarizer μέσω του οποίου γίνεται πολωμένο. Το γραμμικά πολωμένο φως στη συνέχεια μετατρέπεται σε κυκλικά πολωμένο φως μέσω ενός στοιχείου που ονομάζεται photoelastic modulator. Το κυκλικά πολωμένο φως εστιάζεται στο δείγμα και ένα μέρος του απορροφάται με αποτέλεσμα το κυκλικά πολωμένο φως να γίνεται τελικά ελλειπτικά πολωμένο φως (Εικόνα 22). Το ελλειπτικά πολωμένο φως ανιχνεύεται και η ελλειπτικότητα που παρουσιάζει συμβολίζεται με  $\theta$  και μετράται σε μοίρες. Η ελλειπτικότητα στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών.



**Εικόνα 22:** Σχηματική αναπαράσταση του οργάνου του Κυκλικού Διχρωσμού. (B) Αντιπροσωπευτικά φάσματα FAR-UV που δείχνουν τα δευτερογενή πρωτεϊνικά στοιχεία. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η  $\alpha$ -έλικα, με μπλέ το  $\beta$ -φύλλο και με πράσινο το τυχαίο σπείραμα. (Γ) Φάσματα Near-UV πρωτεϊνών που περιέχουν τρυπτοφάνη και τυροσίνη (κόκκινο χρώμα) και μόνο τυροσίνη (μαύρο χρώμα) στο μόριο τους (Pignataro et al., 2020).

Οι περιοχές του φάσματος που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στο κυκλικό διχρωσμό είναι η Far-UV (260-180 nm) και η Near-UV (320-360 nm). Η Far-UV παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα δευτεροταγή στοιχεία του υπό μελέτη πρωτεϊνικού μορίου ( $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -φύλλο, τυχαίο σπείραμα) ενώ η Near-UV μπορεί να χρησιμοποιηθεί η απορρόφηση των καταλοίπων

τρυπτοφάνης, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης για τη παροχή πληροφοριών σχετικά με τη τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η λήψη φασμάτων στη Far-UV αποτελεί έναν εύκολο τρόπο διάκρισης των δευτεροταγών στοιχείων του υπό μελέτη μορίου. Συγκεκριμένα, η  $\alpha$ -έλικα εμφανίζει θετικό μέγιστο στα 190 nm και δύο χαρακτηριστικά αρνητικά ελάχιστα στα 208 και 222 nm. Το  $\beta$ -φύλλο εμφανίζει θετικό μέγιστο στα 195-200 nm και αρνητικό ελάχιστο στα 210-220 nm ενώ το τυχαίο σπείραμα εμφανίζει χαρακτηριστικό αρνητικό ελάχιστο περίπου στα 200 nm (**Εικόνα 22**). Αξίζει να σημειωθεί πως το εύρος που παρατηρείται στις τιμές των ελαχίστων και μεγίστων κορυφών του  $\beta$ -φύλλου στα φάσματα CD είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών διαμορφώσεων του (παράλληλη, αντιπαράλληλη και μεικτή διαμόρφωση).

Ο κυκλικός διχρωσμός λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθούν οι διαμορφωτικές αλλαγές που προκύπτουν από την προσθήκη πιθανών συνδετών, άλλων πρωτεϊνών ή νουκλεικών οξέων σε μια πρωτεΐνη στόχο. Πέραν των διαμορφωτικών αλλαγών που παρατηρούνται στα φάσματα CD σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, μπορούν να ληφθούν φάσματα CD για ένα εύρος θερμοκρασιών που ονομάζονται καμπύλες θερμικής αποδιάταξης. Η λήψη καμπυλών θερμικής αποδιάταξης μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την θερμοκρασία αποδιάταξης ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου παρουσία και απουσία συνδέτη (Pignataro et al., 2020).

### 1.12 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής αποτελεί η *in vitro* αξιολόγηση και η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης με τη πρωτεΐνη MYC αναλόγων ενώσεων των μορίων οδηγών Amy22 και Myc19, με βιοφυσικές μεθόδους.

Για τον σκοπό αυτό δείγματα ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 6xHis - bHLHZ Myc και Max παράχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις από βακτήρια *E.coli* Rosetta και καθαρίστηκαν με βάση καθιερωμένα πρωτόκολλα, βελτιστοποιημένα από μέλη της ομάδας ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιοφυσικές μελέτες.

Η ποιοτική αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης επιλεγμένων ενώσεων με τη Myc και της ικανότητάς τους να διαταράσσουν το ετεροδιμερές Myc-Max πραγματοποιήθηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικές τεχνικές:

- Fluorescence Quenching
- Θερμοφόρηση σε μικροκλίμακα
- Κυκλικός Διχρωμισμός

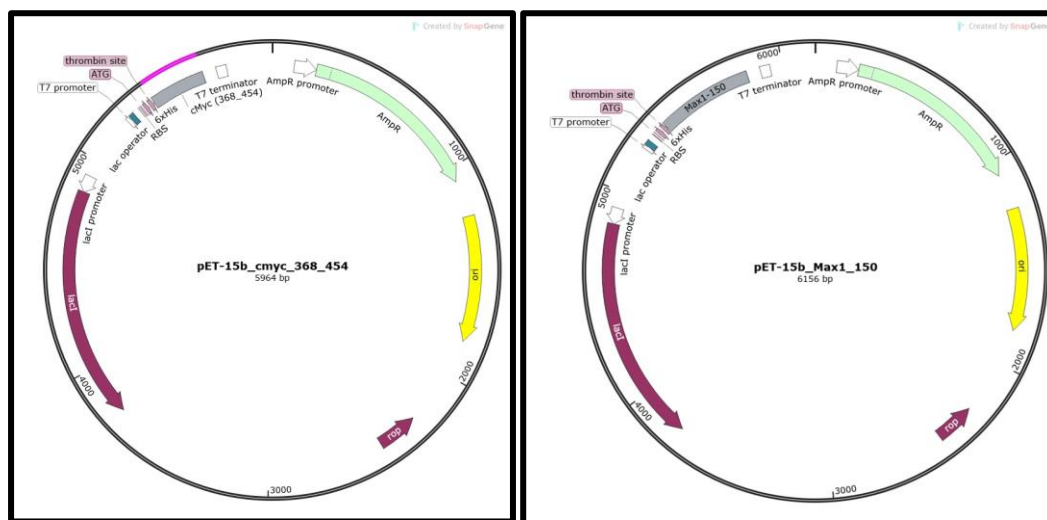
Τέλος, έγινε συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων προκειμένου να εντοπιστούν οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τη Myc και αναστέλλουν πιο αποτελεσματικά τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς Myc-Max.

## **Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι**

## 2.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

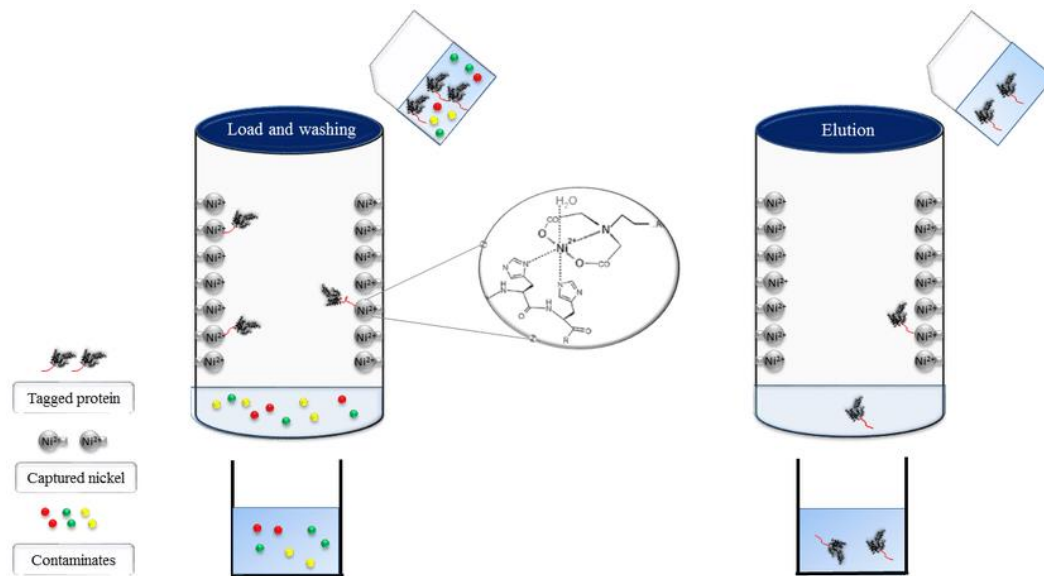
Ο μετασχηματισμός των βακτηριών *E. Coli* με τα επιθυμητά πλασμίδια pET-15b για τις πρωτεΐνες c-Myc και Max, η υπερέκφραση τους στα βακτηριακά στελέχη Rosetta αλλά και ο καθαρισμός τους πραγματοποιήθηκε από τα μέλη του εργαστηρίου Ελένη Βάσση και Κατερίνα Σουψανά.

Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών c-Myc (αα. 368-454) και Max (αα. 1-150), πραγματοποιήθηκε με κλωνοποίηση στους πλασμιδιακούς φορείς pET-15b της **Εικόνας 23**. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως δεν παράγεται όλη η πρωτεΐνη c-Myc αλλά η περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 368-454 και αντιστοιχεί στη περιοχή bHLHLZ. Αντίθετα, η παραγόμενη Max αντιστοιχεί στη πλήρη αλληλουχία.



**Εικόνα 23:** Απεικόνιση των πλασμιδιακών φορέων των πρωτεϊνών c-Myc368-454 και Max1-150. Οι παραπάνω φορείς διαθέτουν ως δείκτη επιλογής ένα γονίδιο που προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη.

Καθώς οι βιοφυσικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευαισθησία, απαιτείται η χρήση πρωτεϊνών υψηλής καθαρότητας. Για τον καθαρισμό των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αξιοποιήθηκε η χρωματογραφία συγγένειας ιόντων νικελίου που καθίσταται δυνατή λόγω της ετικέτας εξαΐστιδίνης (6xHis) των Myc και Max.



**Εικόνα 24:** Σχηματική απεικόνιση ρετινών-NTA- $\text{Ni}^{2+}$  όπου μπορούν να συνδεθούν πρωτεΐνες που φέρουν tag ιστιδίνης. α) Το ακατέργαστο δείγμα που περιέχει την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στόχο φορτώνεται στη στήλη. Οι πρωτεΐνες σύντηξης που έχουν επισημανθεί με το His-tag, συνδέονται στο στερεό υπόστρωμα και διατηρούνται στη στήλη, ενώ τα ανεπιθύμητα κυτταρικά συστατικά εκλύονται από τη στήλη. β) Μετά την πλήρη έκλουση των ρύπων, η αλληλεπίδραση ρητίνης-ετικέτας εξασθενεί μέσω μιας βελτιστοποιημένης στρατηγικής έκλουσης (στη προκειμένη περίπτωση αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζόλης) και οι καθαρές πρωτεΐνες σύντηξης ανακτώνται από τη στήλη.

Για να ελεγχθεί η καθαρότητα και η επάρκεια των παραγόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με συγκέντρωση της πηκτής μίγματος ακρυλαμιδίου-δισακρυλαμιδίου 13.5% και χρώση με Coomassie Blue G250.

## **2.2 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των διαφόρων δειγμάτων απομονωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος βασίζεται στο γεγονός πως η μέγιστη απορρόφηση του διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μεταβάλλεται από τα 465nm στα 595nm, όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η χρωστική προσδέεται κυρίως σε αρωματικά και βασικά αμινοξικά κατάλοιπα και ιδιαίτερα στην αργινίνη, σχηματίζοντας σύμπλοκο 58 μπλε χρώματος. Με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται με βάση γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης, υπολογίζεται η συγκέντρωση της άγνωστης πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης His-cMyc368-454, προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης BSA (Bovine serum albumin). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay) (#500-0006).

## **2.3 Βιοφυσικές τεχνικές**

### **2.3.1 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας (Microscale Thermophoresis, MST)**

#### **2.3.1.1 Protein Labeling**

Προκειμένου να γίνει οποιοδήποτε πείραμα θερμοφόρησης είναι απαραίτητο για τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα να πραγματοποιηθεί πρώτιστα σύνδεση μιας φθορίζουσας χρωστικής με το υπό μελέτη πρωτεϊνικό μόριο. Το όργανο Monolith NT.115 MST για τη διέγερση του φθοροφόρου χρησιμοποιεί κόκκινο φίλτρο LED με μήκη κύματος διέγερσης 600–650 nm και μήκη κύματος εκπομπής στα 650 -725 nm. Σε αυτή τη περίπτωση ως protein-tag χρησιμοποιείται το Red-Tris-NTA. Η σύνδεση του φθοροφόρου γίνεται στην ουρά 6x-His της Myc.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για το Protein Labeling στην παρούσα μελέτη ήταν το εξής:

- Απόψυξη του stock πρωτεΐνης Myc-His που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί.
- Φυγοκέντρηση της πρωτεΐνης για 15 min στα 13.000 rpm στους 4°C.
- Παρασκευή 10ml διαλύματος PBS-0.05% Tween.
- Διαλυτοποίηση της χρωστικής Red-Tris-NTA σε 100μl PBS-0.05%Tween για τη παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 2,5 μM.
- Παρασκευή διαλύματος χρωστικής συγκέντρωσης 50nM.
- Παρασκευή διαλύματος πρωτεΐνης συγκέντρωσης 200nM.
- Ανάμιξη των διαλυμάτων χρωστικής (50nM) και πρωτεΐνης (200nM) σε αναλογία 1:1 με σκοπό τη παρασκευή τελικού διαλύματος συγκέντρωσης 100nM όπου η πρωτεΐνη συνδέεται με τη χρωστική (εφεξής labeled protein).
- Επώαση του διαλύματος για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτεινό θάλαμο.
- Φυγοκέντρηση για 10 min στα 13.000 rpm στους 4°C και μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα νέο Eppendorf.

#### **2.3.1.2 Binding test**

Για τη ποιοτική αξιολόγηση της σύνδεσης των υπό μελέτη μορίων στη πρωτεΐνη στόχο (Myc-His) ένα από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Binding test.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό :

- Παρασκευή 1ml ligand buffer (PBS-0,05%Tween - 10% DMSO). Το διάλυμα αυτό είναι απαραίτητο για τη σύγκριση των control (πρωτεΐνη δίχως φάρμακο) με τα δείγματα φαρμάκου-πρωτεΐνης, καθώς εκτός από PBS-Tween στα δείγματα περιέχεται ο διαλύτης των φαρμάκων (DMSO). Έτσι τόσο στα δείγματα όσο και στα control η τελική συγκέντρωση του διαλύτη (DMSO) διατηρείται στο 5%.
- Παρασκευή διαλύματος labeled protein συγκέντρωσης 50 nM που προκύπτει από την ανάμιξη ίσων ποσοτήτων διαλύματος 100nM labeled protein με PBS-0.05%Tween.
- Παρασκευή διαλύματος φαρμάκου 10mM που προκύπτει από την ανάμιξη μιας ποσότητας του stock φαρμάκου με μια ποσότητα PBS-0,05%Tween σε αναλογία 1:10.
- Παρασκευή του διαλύματος control (Myc-His 25nM - 5% DMSO) που προκύπτει από την ανάμιξη ίσων ποσοτήτων διαλύματος tag-πρωτεΐνης 50nM και του ligand buffer.
- Παρασκευή του δείγματος (Myc-His 25nM - 1mM φαρμάκου - 5% DMSO) που προκύπτει από την ανάμιξη ίσων όγκων διαλύματος tag-πρωτεΐνης 50nM και διαλύματος φαρμάκου 10mM.



- Φόρτωση των διαλυμάτων control και sample σε ειδικά τριχοειδή που χρησιμοποιούνται στο MST και μέτρηση των δειγμάτων. Προκειμένου να υφίσταται στατιστικό αποτέλεσμα χρησιμοποιούνται 4 τριχοειδή για το control και 4 για το εκάστοτε δείγμα, ενώ η μέτρηση για κάθε φάρμακο επαναλαμβάνετε τρεις φορές.

### 2.3.2 Απόσβεση Φθορισμού

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η απόσβεση φθορισμού είναι μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-συνδέτη. Στη παρούσα μελέτη η χρήση φθορισμομετρικών τεχνικών είναι δυνατή (δίχως την χρήση κάποιας ετικέτας) λόγω του εγγενούς φθορισμού της Myc που οφείλεται στο αρωματικό κατάλοιπο Tyr στη περιοχή bHLHZ.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το εξής:

- Απόψυξη του stock πρωτεΐνης Myc-His που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί.
- Φυγοκέντρηση της πρωτεΐνης για 15 min στα 13.000 rpm στους 4°C.
- Προετοιμασία δειγμάτων control :
  - Ένα δείγμα που περιέχει μόνο τη πρωτεΐνη Myc. Το διάλυμα αυτό έχει όγκο 700μl και αποτελείται από 1mM DTT, 1xPBS και 5% DMSO.
  - Και δείγματα που περιέχουν μόνο τις διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του φαρμάκου. Τα διαλύματα αυτά (τελικού όγκου 700μl) περιέχουν 1mM DTT, 1xPBS και DMSO (η ποσότητα του οποίου προσαρμόζεται ανάλογα με τη ποσότητα φαρμάκου ώστε το τελικό DMSO του δείγματος να είναι 5%). Στα διαλύματα αυτά προστίθενται επίσης διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100 μM για τις ενώσεις T226-1216, DP-01941, KM-01958, JPV-00088, SCR00630, PB324795808 και συγκεντρώσεις 0, 2,5, 5, 10, 20, 50, 100 μM για τις ενώσεις Myci57, Myci63, Myci53, Myci23s.
- Προετοιμασία δειγμάτων πρωτεΐνης - φαρμάκου. Τα διαλύματα αυτά (τελικού όγκου 700μl) περιέχουν 10μM Myc, 1mM DTT, 1xPBS και DMSO (η ποσότητα του οποίου προσαρμόζεται ανάλογα με τη ποσότητα φαρμάκου ώστε το τελικό DMSO του δείγματος να είναι 5%). Στα διαλύματα αυτά προστίθενται επίσης διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100 μM για τις ενώσεις T226-1216, DP-01941, KM-01958, JPV-00088, SCR00630, PB324795808 και συγκεντρώσεις 0, 2,5, 5, 10, 20, 50, 100 μM για τις ενώσεις Myci57, Myci63, Myci53, Myci23s.
- Επώαση δειγμάτων για 1hr στους 20°C σε συσκευή υπερήχων.
- Μέτρηση δειγμάτων στο φθορισμόμετρο.

### 2.3.3 Κυκλικός Διχρωισμός

Ο κυκλικός διχρωισμός, είναι τεχνική που στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης θα χρησιμοποιηθεί για τη ποιοτική αξιολόγηση της σύνδεσης πρωτεΐνης-προσδέματος. Η τεχνική αυτή παρέχει τη δυνατότητα παρατήρησης διαμορφωτικών αλλαγών στο σύμπλοκο των πρωτεϊνών Myc-Max πριν και μετά τη προσθήκη κάποιου συνδέτη. Πέραν των διαμορφωτικών αλλαγών που παρατηρούνται στα φάσματα CD σε συγκεκριμένη θερμοκρασία, μπορούν να ληφθούν φάσματα CD για ένα εύρος θερμοκρασιών που ονομάζονται καμπύλες θερμικής αποδιάταξης. Η λήψη καμπυλών θερμικής αποδιάταξης μπορεί να μας δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη θερμοκρασία αποδιάταξης ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου και κατ' επέκταση για την ικανότητα του συνδέτη να αποδιάτασσει το σύμπλοκο (Pignataro et al., 2020).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι το εξής:

- Απόψυξη του stock πρωτεΐνης Myc-His που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί.
- Φυγοκέντρηση της πρωτεΐνης για 15 min στα 13.000 rpm στους 4°C.
- Προετοιμασία δειγμάτων control :
  - Ένα δείγμα που περιέχει μόνο τα συστατικά του Buffer. Το διάλυμα τελικού όγκου 150μl αποτελείται από 1mM TCEP, 150mM NaCl, 50mM Phosphate PH = 7.5 και 5% DMSO ή EtOH.
  - Ένα δείγμα που περιέχει μόνο τη πρωτεΐνη Myc. Το διάλυμα τελικού όγκου 150μl αποτελείται από 1mM TCEP, 150mM NaCl, 50mM Phosphate PH = 7.5, 5% DMSO ή EtOH και 25μM Myc.
  - Ένα δείγμα που περιέχει μόνο τη πρωτεΐνη Max. Το διάλυμα τελικού όγκου 150μl αποτελείται από 1mM TCEP, 150mM NaCl, 50mM Phosphate PH = 7.5, 5% DMSO ή EtOH και 25μM Max.
  - Ένα δείγμα που περιέχει τις πρωτεΐνες Myc και Max. Το διάλυμα τελικού όγκου 150μl αποτελείται από 1mM TCEP, 150mM NaCl, 50mM Phosphate PH = 7.5, 5% DMSO ή EtOH, 25μM Max και 25μM Myc.
- Προετοιμασία δειγμάτων πρωτεϊνικού συμπλόκου Myc-Max - φαρμάκου. Τα διαλύματα τελικού όγκου 150μl αποτελούνται από 1mM TCEP, 150mM NaCl, 50mM Phosphate PH = 7.5, 25μM Max, 25μM Myc και 100μM φαρμάκου.
- Για τη παρασκευή των δειγμάτων πρωτεϊνικού συμπλόκου Myc-Max – φαρμάκου, το φάρμακο αρχικά επωάζεται μόνο με τη πρωτεΐνη Myc για 1hr σε συσκευή υπερήχων στους 20°C. Αφού περάσει το συγκεκριμένο διάστημα, στο διάλυμα προστίθεται και η Max και η διαδικασία επώασης επαναλαμβάνεται στις ίδιες συνθήκες για άλλη μια ώρα. Επίσης συνεπώς τα δείγματα control προκειμένου οι πειραματικές συνθήκες να παραμένουν ίδιες σε κάθε δείγμα.
- Τα δείγματα μετρούνται στο όργανο CD στους 20°C για να ληφθούν φάσματα κυκλικού διχρωισμού και στο θερμοκρασιακό εύρος 15°C-75°C για να ληφθούν καμπύλες θερμικής αποδιάταξης.

## **Τρίτο κεφάλαιο: Αποτελέσματα**

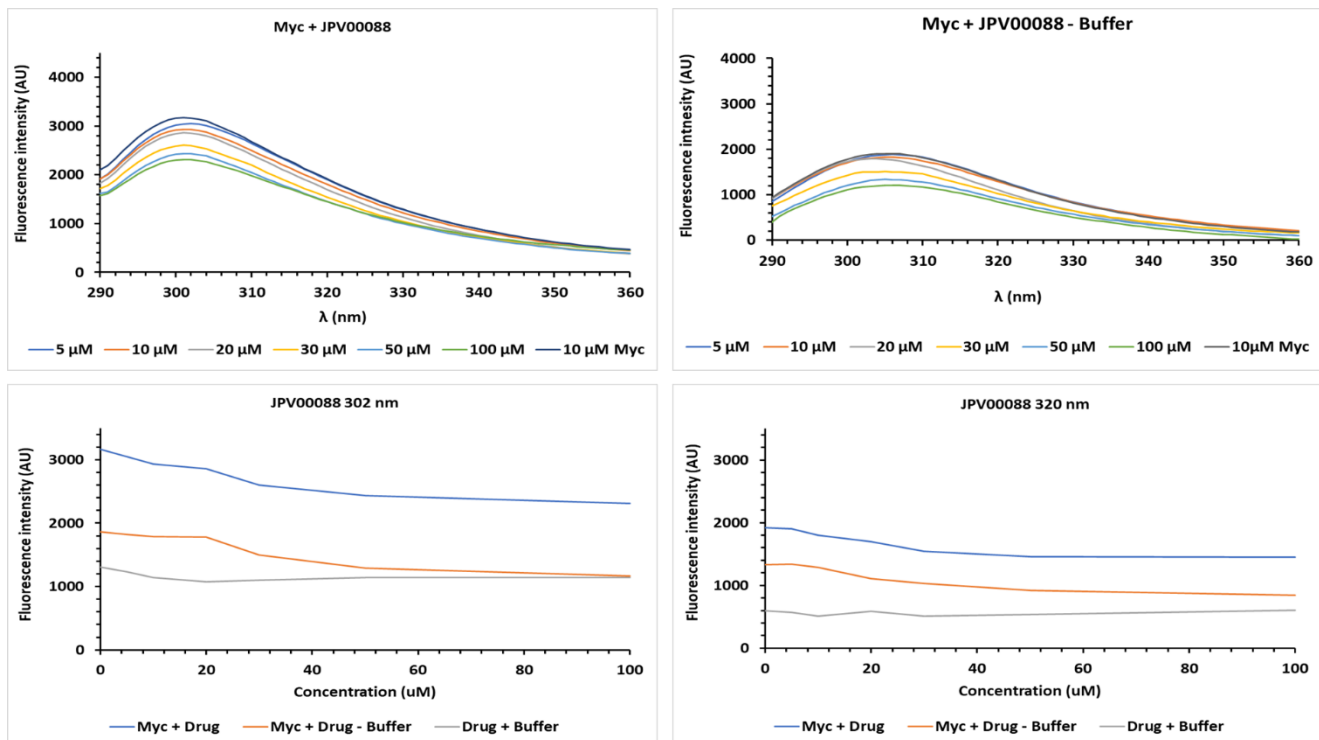
Στο πλαίσιο της διπλωματικής οι ενώσεις που στοχεύουν το σύμπλοκο Myc-Max μελετήθηκαν με τη χρήση τριών τεχνικών :

- A) Την απόσβεση φθορισμού
- B) Τον κυκλικό διχρωισμό
- Γ) Τη θερμοφόρηση μικροκλίμακας

Παρακάτω αξιολογούνται δύο κατηγορίες ενώσεων :

- A) Οι ενώσεις *T226-1216*, *DP-01941*, *KM-01958*, *JPV-00088*, *SCR00630*, *PB324795808* που αποτελούν ανάλογα της ένωσης *Amy22*
- B) Οι ενώσεις *Myci53,63 & 57* που αποτελούν ανάλογα της ένωσης *Myci19*

### 3.1 Απόσβεση Φθορισμού για τα ανάλογα του Amy22

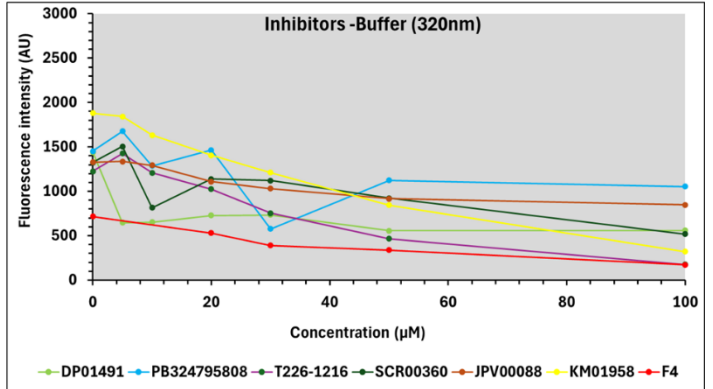
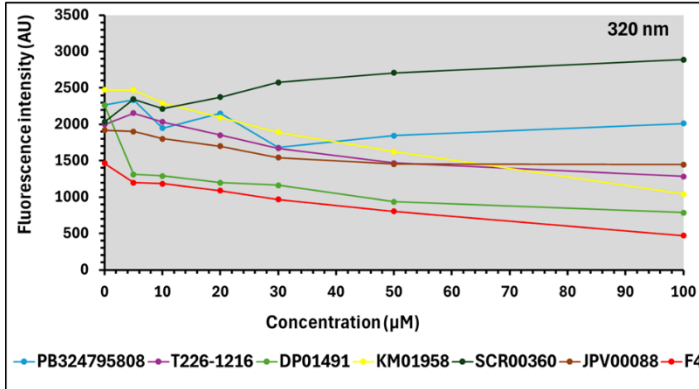
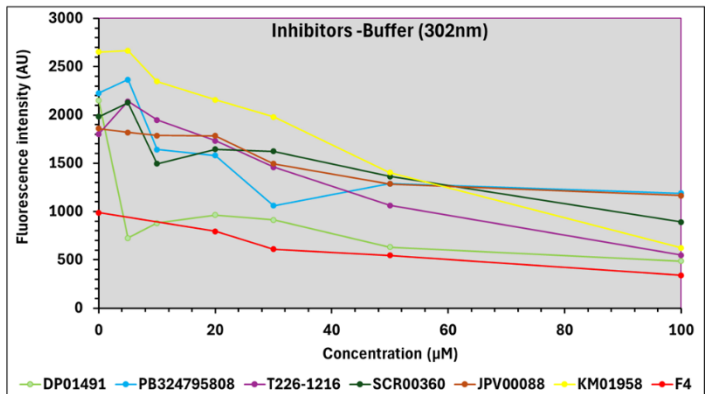
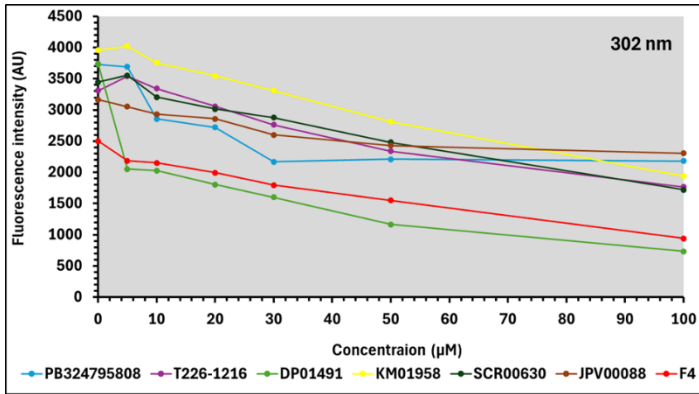


**Εικόνα 25:** Διαγράμματα έντασης φθορισμού – μήκους κύματος (nm) που δείχνουν τη μεταβολή της έντασης του φθορισμού της Myc με σταδιακή προσθήκη του JPV-00088, πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου, στα 302 και 320nm. Επίσης παρουσιάζονται διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης στα 302 και 320nm που δείχνουν πως μεταβάλεται η ένταση του φθορισμού της πρωτεΐνης παρουσία της ένωσης, της πρωτεΐνης παρουσία της ένωσης μετά από αφαίρεση του σήματος υποβάθρου και των δειγμάτων control (που δημιουργούν το σήμα υποβάθρου).

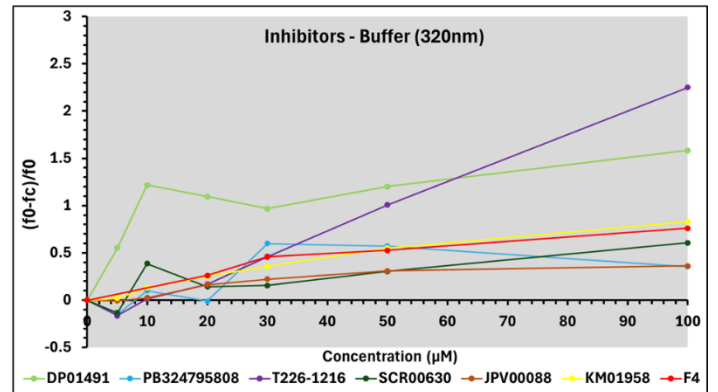
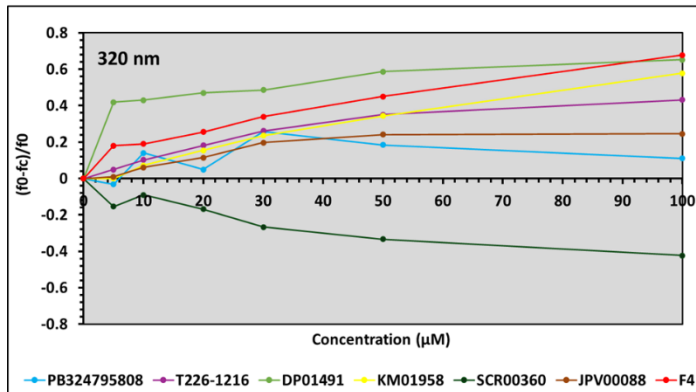
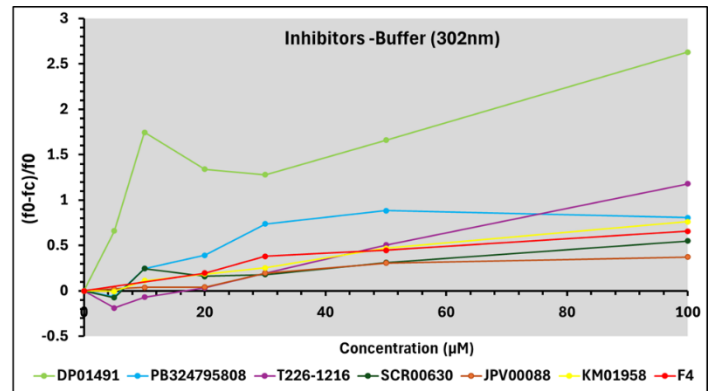
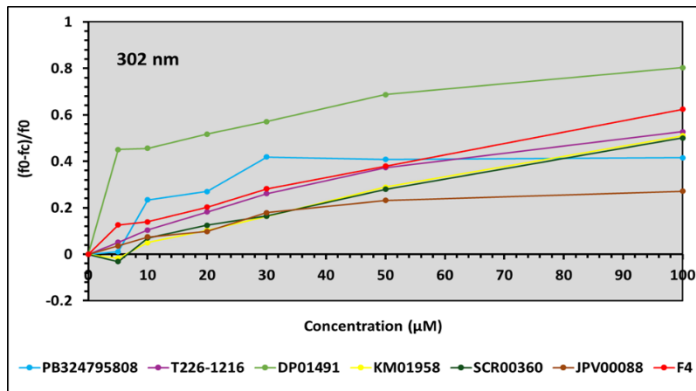
Η χρήση αυτής της τεχνικής είναι δυνατή λόγω του καταλοίπου Tyr στη περιοχή bHLHZ της Myc, που προσδίδει στη πρωτεΐνη εγγενή φθορισμό. Συνακόλουθα, η προσθήκη μιας ένωσης που αλληλεπιδρά με τη Myc αναμένεται να μειώσει τον εγγενή φθορισμό. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της ένωσης JPV-00088 φαίνονται στην **Εικόνα 25** και η αντίστοιχη διαδικασία περιγράφεται αμέσως παρακάτω. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα ανάλογα του Amy22. Σύμφωνα με τη παραπάνω λογική δημιουργήθηκαν διαλύματα διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων -5μM, 10μM, 20μM, 30μM, 50μM, 100μM- της ένωσης JPV-00088 που

επώαστηκε μαζί με 10μM Myc. Προκειμένου να αφαιρεθεί τυχόν φθορισμός που απορρέει από τα συστατικά του Buffer ή την ίδια την ένωση δημιουργήθηκαν διαλύματα Buffer – JPV-00088 (control), μετρήθηκε ο φθορισμός τους και έπειτα αφαιρέθηκε από τα διαλύματα Myc - JPV-00088. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων δημιουργήθηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού – μήκους κύματος (290nm – 360nm) για τις περιπτώσεις επώασης της Myc με την υπό μελέτη ένωση και της Myc με την ένωση αφού αφαιρέθηκε ο φθορισμός που οφείλεται στο Buffer και το JPV-00088. Και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται πως ο εγγενής φθορισμός της πρωτεΐνης μειώνεται όλο και περισσότερο, καθώς μεταβαίνουμε από τα 5μM φαρμάκου στα 100μM. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ένδειξη πως το φάρμακο αλληλεπιδρά με τη bHLHZ της Myc. Επιπρόσθετα, δημιουργήθηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού συναρτήσεων των συγκεντρώσεων της ένωσης για τα 302nm και 320nm. Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζονται ταυτόχρονα οι καμπύλες φθορισμού των δειγμάτων που διέθεταν JPV-00088 και πρωτεΐνη, των δειγμάτων που διέθεταν μόνο buffer και JPV-00088 καθώς και η καμπύλη που προκύπτει από τη μεταξύ τους αφαίρεση. Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα τόσο στη περίπτωση των 302nm (που είναι το μέγιστο εκπομπής της Tyr) όσο και στα 320nm η καμπύλη που προκύπτει από τη αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου από τα δείγματα πρωτεΐνης που συνεπώαστηκαν με την ένωση διαφέρει αισθητά από την αντίστοιχη των δειγμάτων control. Αυτή η διαφορά αντιστοιχεί στην ένταση φθορισμού που οφείλεται αποκλειστικά στην Myc και εφόσον μειώνεται καθώς αυξάνει η συγκέντρωση της ένωσης μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια πως η ένωση αλληλεπιδρά με τη Myc.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις ενώσεις T226-1216, DP-01941, KM-01958, SCR00630, PB324795808 και F4. Μετά την ολοκλήρωση αντίστοιχων πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού δημιουργήθηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού - συγκέντρωσης στα 302 και 320 nm που περιέχουν όλες τις ενώσεις μαζί προκειμένου να γίνει δυνατή η σύγκριση τόσο μεταξύ τους όσο και με τον γνωστό αναστολέα F4. Αρχικά δημιουργήθηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού των δειγμάτων πρωτεΐνης φαρμάκου αλλά προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα λήψης ψευδών αποτελεσμάτων από τον φθορισμό συστατικών του Buffer ή του φαρμάκου στη περιοχή όπου φθορίζει η Myc, δημιουργήθηκαν επίσης διαγράμματα όπου αφαιρέθηκε ο φθορισμός λόγω Buffer και ένωσης. Τα διαγράμματα αυτά δείχνουν την μείωση της έντασης του φθορισμού σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης συνδέτη που οφείλεται αποκλειστικά στον φθορισμό της πρωτεΐνης. Περαιτέρω, η ένταση φθορισμού των ενώσεων κανονικοποιήθηκε προκειμένου οι καμπύλες φθορισμού να ξεκινούν από κοινό σημείο αναφοράς. Συνεπώς, δημιουργήθηκαν διαγράμματα  $f_0 - f_c / f_0$  (όπου  $f_0$  : ο αρχικός φθορισμός της πρωτεΐνης,  $f_c$  : ο φθορισμός της ένωσης για την αντίστοιχη συγκέντρωση φαρμάκου) - συγκέντρωσης για το φθορισμό της πρωτεΐνης παρουσία συνδέτη και για το φθορισμό της πρωτεΐνης παρουσία συνδέτη μετά από αφαίρεση του φθορισμού του Buffer στα 302nm και 320nm.

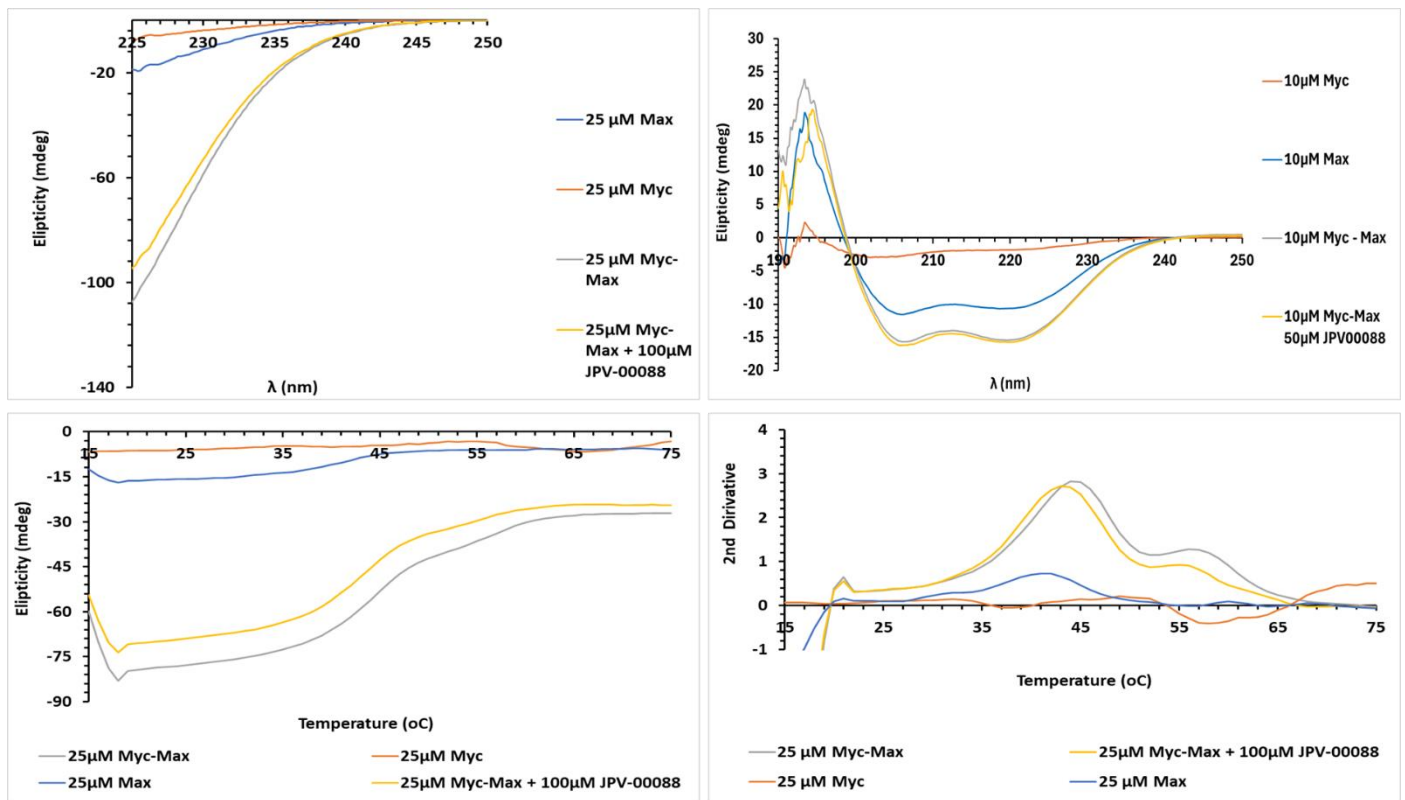


**Εικόνα 26:** Διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης των ενώσεων T226-1216, DP-01941, KM-01958, SCR00630, JPV-00088, PB324795808 και F4 πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου (φθορισμός που οφείλεται στο Buffer και την ένωση) στα 302 και 320nm.



**Εικόνα 27:** Διαγράμματα  $f_0 - f_c / f_0$  – συγκέντρωσης των ενώσεων T226-1216, DP-01941, KM-01958, SCR00630, JPV-00088, PB324795808 και F4 πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου (φθορισμός που οφείλεται στο Buffer και την ένωση) στα 302 και 320nm.

### 3.2 Κυκλικός Διχρωσμός για τα ανάλογα του Amy22



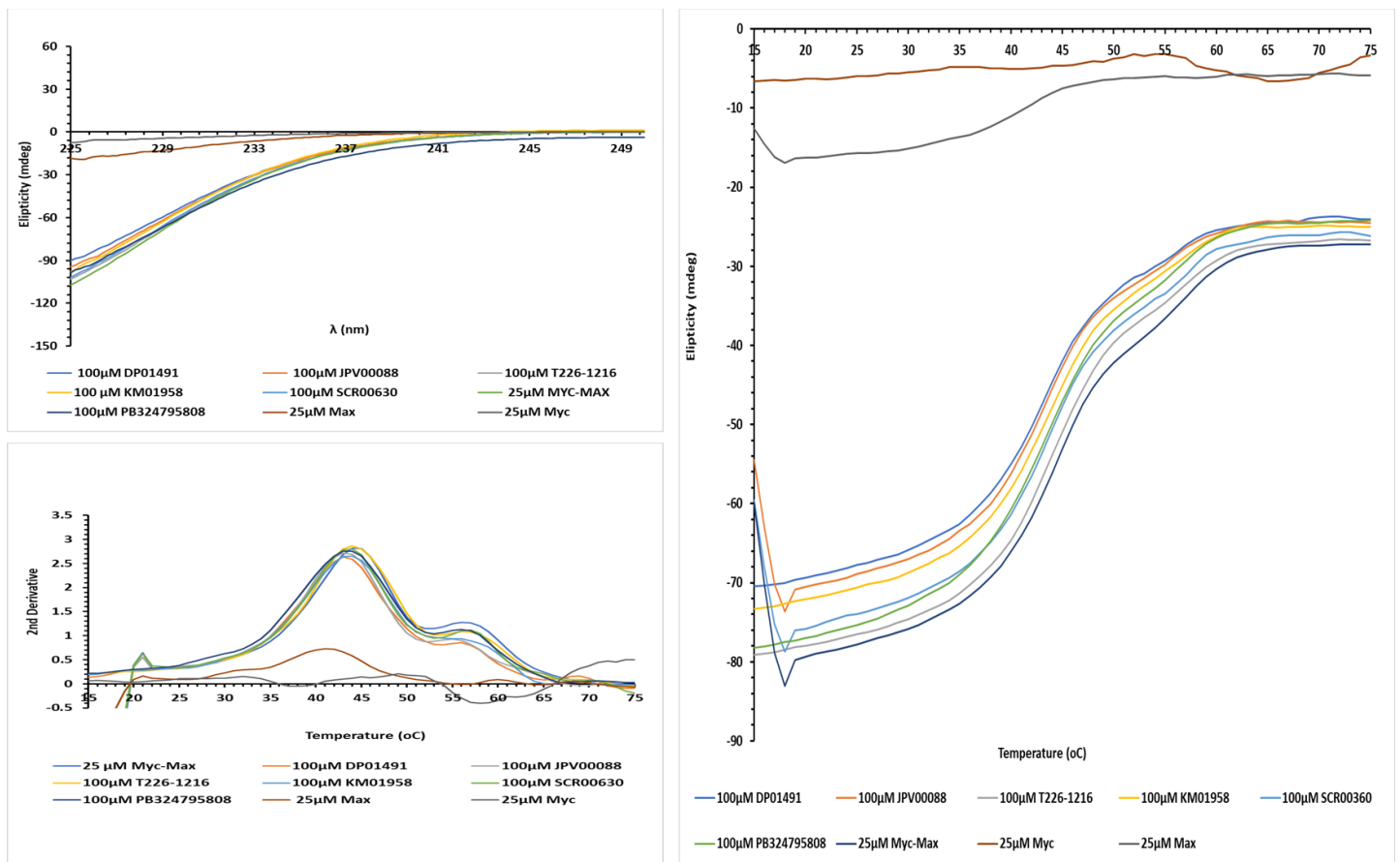
**Εικόνα 28:** Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα διαγράμματα των φασμάτων CD σε 5% DMSO (225-250nm) στους 20 °C (πάνω αριστερά) και 5% EtOH (190-250nm) στους 20 °C (πάνω δεξιά), των καμπυλών θερμικής αποδιάταξης στο εύρος θερμοκρασιών 15oC έως 75oC (κάτω αριστερά) και της δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών (κάτω δεξιά) για την ένωση JPV-00088 σε 5% DMSO. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί πως για τα φάσματα σε 5% EtOH οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών Myc και Max που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10 μM ενώ για τη λήψη των φασμάτων σε 5% DMSO χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις πρωτεϊνών στα 25μM.

Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη ποιοτική μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός συνδέτη με το σύμπλοκο Myc-Max. Η αλληλεπίδραση γίνεται αντιληπτή από τη μεταβολή της δευτεροταγούς δομής του συμπλόκου παρουσία συνδέτη σε σχέση με τα δείγματα control. Συγκεκριμένα, η α-έλικα εμφανίζει ένα θετικό μέγιστο στα 190 nm και δύο χαρακτηριστικά αρνητικά ελάχιστα στα 208 και 222 nm. Στην **Εικόνα 28** παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού των Myc, Max, Myc-Max και Myc-Max + JPV-00088. Στα φάσματα που καταγράφηκαν παρουσία DMSO (για την καλύτερη διαλυτοποίηση του φαρμάκου, πάνω αριστερά) φαίνεται ένα μόνο μέρος του δευτέρου ελαχίστου της α-έλικας στα 225nm. Η λήψη του πλήρους φάσματος από 190nm – 250nm δεν ήταν δυνατή καθώς ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το DMSO και ο θόρυβος που δημιουργείται λόγω της παρουσίας του κάτω από τα 222nm καλύπτει το φάσμα της πρωτεΐνης. Η ύπαρξη και η έκταση της α-έλικας αξιολογούνται από το πλήρες φάσμα CD που μπορεί να καταγραφεί σε υδατικό διάλυμα, γι' αυτό στην **Εικόνα 28** που περιέχεται το διάγραμμα ελλειπτικότητας (mdeg) – μήκους κύματος (nm) του JPV00088 σε EtOH (πάνω δεξιά) παρατηρούμε πως στη περίπτωση της Myc η ελλειπτικότητα είναι ελάχιστη γεγονός που οφείλεται στη αδόμενη φύση της πρωτεΐνης και στην έλλειψη σχηματισμού ομοδιμερών. Στη περίπτωση της Max η ελλειπτικότητα αυξάνει αφού η διαμορφωτική ευελιξία της πρωτεΐνης είναι μικρότερη σε σχέση με τη Myc και σχηματίζεται α-έλικα με ομοδιμερισμό της Max. Τέλος, παρατηρούμε υψηλή αύξηση της ελλειπτικότητας και της α-έλικας στη περίπτωση του ετεροδιμερούς Myc-Max το οποίο αποκτά μια σταθερή στερεοδιαμόρφωση. Η προσθήκη του JPV-00088 δεν φαίνεται να επηρεάζει τη στερεοδιαμόρφωση του συμπλόκου αφού η ελλειπτικότητα του συμπλόκου παρουσία συνδέτη μεταβάλλεται ανεπαίσθητα σε σχέση με το σύμπλοκο χωρίς τη παρουσία της ένωσης.

Πέραν των φασμάτων CD σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία (20°C) πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ελλειπτικότητας των δειγμάτων σε ένα εύρος θερμοκρασιών (15°C – 75°C) με σκοπό τη δημιουργία καμπυλών θερμικής αποδιάταξης

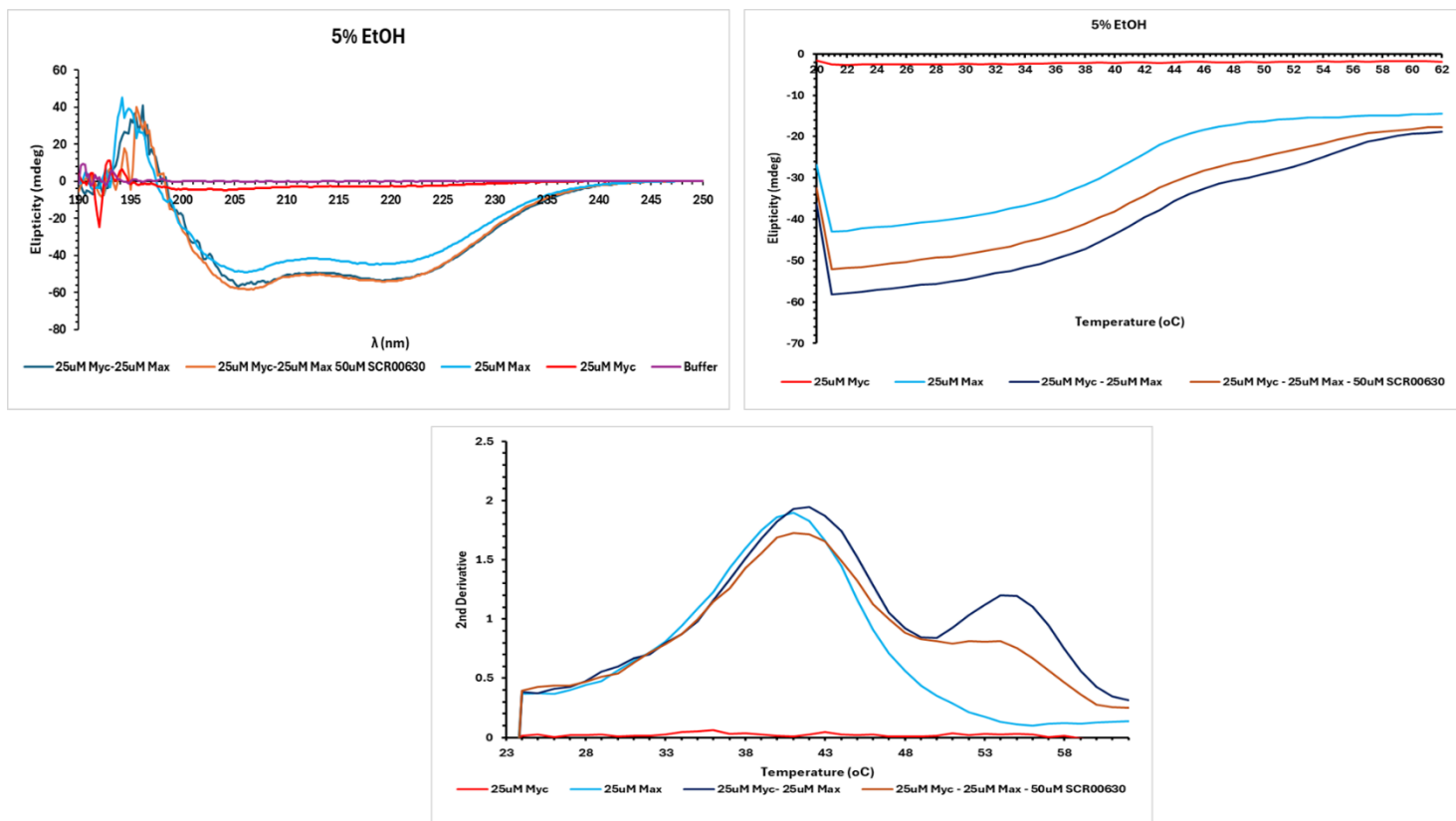
(**Εικόνα 28**, επάνω δεξιά). Μια άλλη ανάγνωση των καμπυλών αυτών επιτυγχάνεται με διαγράμματα της δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε σχέση με τη θερμοκρασία (**Εικόνα 28**, κάτω δεξιά). Οι καμπύλες καταδεικνύουν τις θερμοκρασίες που θα συμβεί η αποδιάταξη του ετεροδιμερούς παρουσία και απουσία συνδέτη (Tm). Από τα διαγράμματα παρατηρούμε πως η Myc δεν παρουσιάζει σιγμοειδή καμπύλη ή μέγιστο παραγώγου, επειδή δεν υιοθετεί σε μεγάλο βαθμό δευτεροταγή δομή ούτε σχηματίζει ομοδιμερές. Στην περίπτωση της Max έχουμε τη δημιουργία ομοδιμερών α-έλικας και η αποδιάταξη τους σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα συμβαίνει στους 42°C. Στη περίπτωση του συμπλόκου Myc-Max παρατηρούνται δύο κορυφές μια στους 45°C που αντιστοιχεί στην αποδιάταξη του ομοδιμερούς Max-Max και μια στους 57°C που αντιστοιχεί στην αποδιάταξη του ετεροδιμερούς Myc-Max, που είναι πολύ σταθερότερο. Παρουσία του JPV-00088 παρατηρούμε πως αυτές οι κορυφές εμφανίζονται στους 43°C και 55°C αντίστοιχα.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε ένα από τα ανάλογα του Amy22 και δημιουργήθηκαν αντίστοιχα διαγράμματα που περιέχουν τα φάσματα όλων των ενώσεων και τις αντίστοιχες θερμικές καμπύλες ώστε να καθίσταται δυνατή η μεταξύ τους σύγκριση αλλά και η σύγκριση τους με το ετεροδιμερές Myc-Max. Τα συνολικά διαγράμματα των φασμάτων CD, των θερμικών καμπυλών και της δεύτερης παραγώγου των θερμικών καμπυλών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 29**.



**Εικόνα 29:** Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα των φασμάτων CD (225-250nm) στους 20°C (αριστερά), των θερμικών καμπυλών στο εύρος θερμοκρασιών 15°C έως 75°C (πάνω δεξιά) και των δεύτερων παραγώγων των θερμικών καμπυλών στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών (κάτω δεξιά).

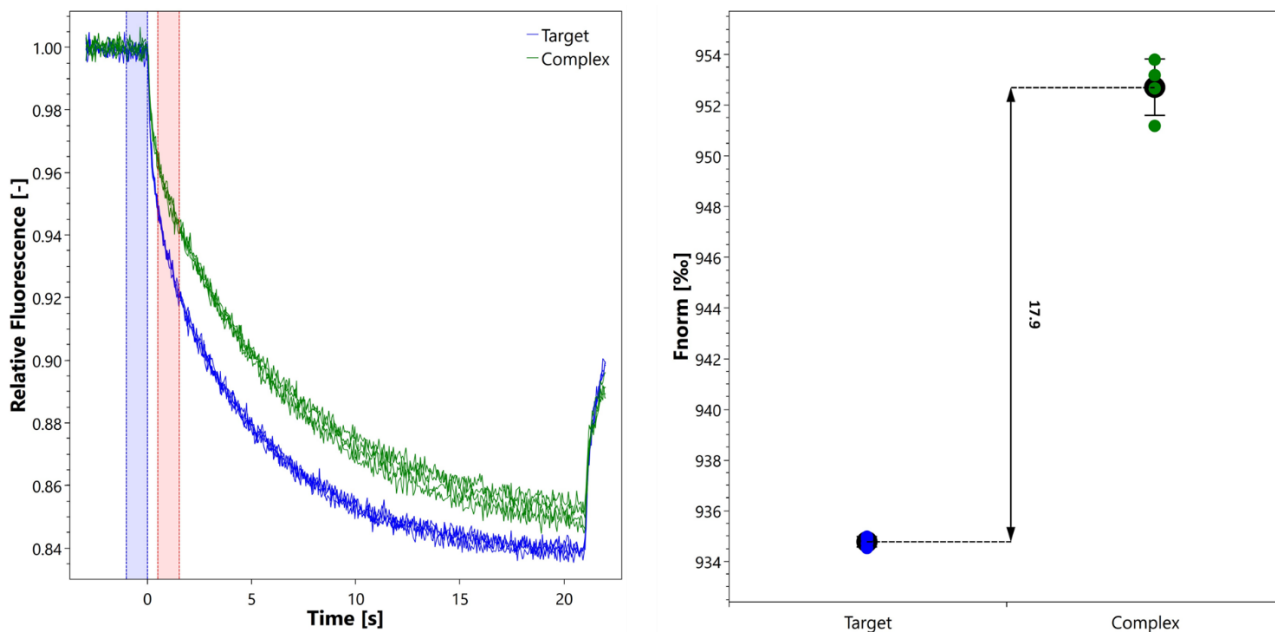




**Εικόνα 30:** Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα των φασμάτων CD (190 - 250nm) στους 20°C (αριστερά), των θερμικών καμπυλών στο εύρος θερμοκρασιών 20°C έως 62°C (πάνω δεξιά) και των δεύτερων παραγώγων της ελλειπτικότητας στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών (κάτω).

Επιπλέον, προκειμένου να καταγραφούν πλήρη φάσματα έγιναν πρόσθετα πειράματα σε διαλύματα με 5% αιθανόλη. Ενδεικτικά στην **Εικόνα 30** απεικονίζονται τα αποτελέσματα για την ένωση SCR00630 ως αντιπροσωπευτική των ενώσεων αυτής της κατηγορίας. Συνεπώς λήφθηκε φάσμα CD σε 5% EtOH από 190 nm έως 250 nm στους 20°C. Σε αντίθεση με το DMSO η περιοχή απορρόφησης της EtOH είναι κάτω από 200nm, επιτρέποντας τη λήψη πλήρους φάσματος κυκλικού διχρωισμού. Στο φάσμα αυτό εμφανίζονται και τα δύο χαρακτηριστικά αρνητικά ελάχιστα της α-έλικας στα 208 και 222 nm. Επιπλέον, η ελλειπτικότητα των δειγμάτων Myc-Max-SCR00630 και των αντίστοιχων control (Myc, Max & Myc-Max) μετρήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 20°C έως 62°C για να δημιουργηθούν καμπύλες θερμικής αποδιάταξης. Τέλος, για την καλύτερη παρουσίαση των θερμικών καμπυλών δημιουργήθηκαν διαγράμματα της δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε σχέση με τη θερμοκρασία. Με βάση το διάγραμμα της δεύτερης παραγώγου η θερμοκρασία αποδιάταξης της Max είναι 41°C, οι θερμοκρασίες αποδιάταξης του συμπλόκου Myc-Max είναι 42°C (πρώτη κορυφή που αντιστοιχεί στα ομοδιμερές Max-Max) και 54°C (δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στα ετεροδιμερές Myc-Max), οι θερμοκρασίες αποδιάταξης του συμπλόκου Myc-Max – 50uM SCR00630 είναι 42 °C (πρώτη κορυφή) και 54°C (δεύτερη κορυφή).

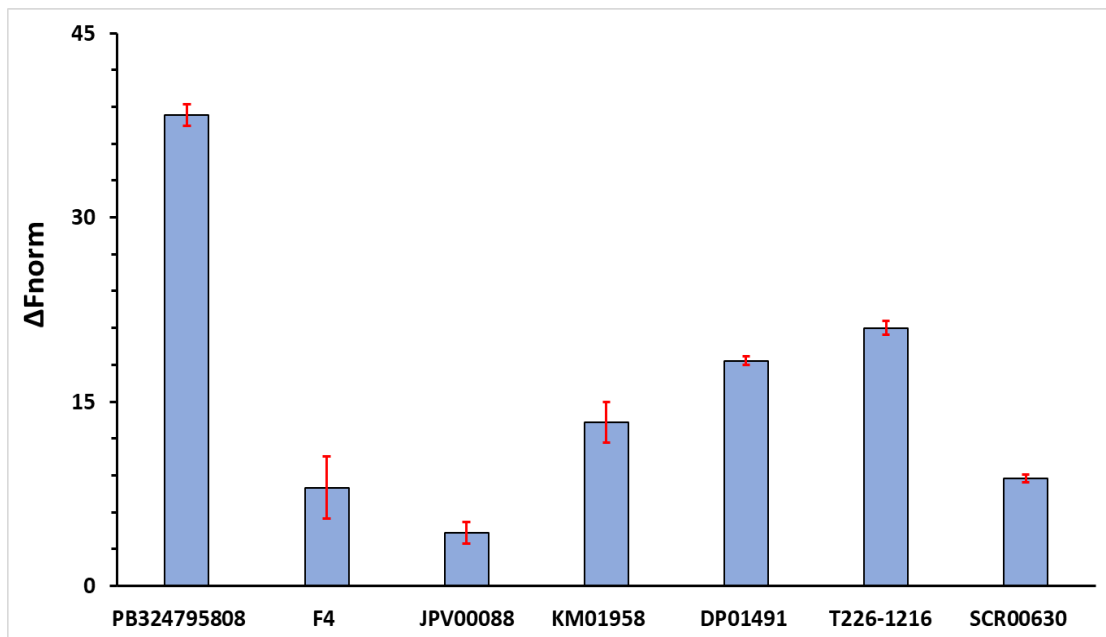
### 3.3 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας για τα ανάλογα του Amy22



**Εικόνα 31:** Δεξιά παρουσιάζονται τα διαγράμματα Σχετικού Φθορισμού – Χρόνου που περιλαμβάνουν τα ίχνη MST για το σύμπλοκο Myc – DP01491 (complex) και της Myc (target) καθώς και η μεταξύ τους διαφορά που ονομάζεται εύρος απόκρισης. Αριστερά στο γράφημα των target και complex σε σχέση με τον Fnorm υπολογίζεται μια σχετική τιμή του εύρους απόκρισης.

Η τρίτη τεχνική που αξιοποιήθηκε στη ποιοτική αξιολόγηση των ενώσεων στο πλαίσιο της διπλωματικής είναι η θερμοφόρηση σε μικροκλίμακα. Η θερμοφόρηση μικροκλίμακας αποτελεί μια πλήρως οπτική τεχνική που μπορεί να αξιοποιηθεί για τη λήψη ποιοτικών και ποσοτικών πληροφοριών σχετικά με την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-συνδέτη. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται στη ποιοτική αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης ονομάζεται Binding test (έχει αναλυθεί παραπάνω). Σε αυτό το πρωτόκολλο, μια μικρή ποσότητα πρωτεΐνης (συνήθως 25nM) που σημαίνεται με φθορίζουσα χρωστική (Red-Tris-NTA) χρησιμοποιείται μαζί, με μια αναλογικά μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου (συνήθως 5mM) για να δημιουργηθούν δύο δείγματα, ένα control που περιέχει μόνο τη πρωτεΐνη (target) και ένα που περιέχει τη πρωτεΐνη και την υπό μελέτη ένωση (Complex). Για να υπάρχει στατιστικό αποτέλεσμα χρησιμοποιούνται 8 capillaries σε κάθε κύκλο πειραμάτων, 4 για τα δείγματα control και 4 για τα δείγματα που περιέχουν το σύμπλοκο πρωτεΐνης-συνδέτη. Επιπλέον, κάθε κύκλος πειραμάτων επαναλαμβάνεται για κάθε ένωση τρεις φορές. Μετά την ολοκλήρωση ενός κύκλου πειραμάτων το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από την θερμοφόρηση των δειγμάτων είναι ένα διάγραμμα Σχετικού Φθορισμού – Χρόνου. Στην **Εικόνα 31** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα ενός εκ των τριών κύκλων του πειράματος Binding Check για την ένωση DP01491 (5mM) σε σχέση με τη Myc (25nM). Οι καμπύλες που εμφανίζονται στο διάγραμμα ονομάζονται MST-traces και αντιπροσωπεύουν το complex (ίχνη πράσινου χρώματος) και τον target (ίχνη μπλέ χρώματος) αντίστοιχα. Για κάθε τριχοειδές, καταγράφεται ένα MST trace και στη συνέχεια όλα τα ίχνη κανονικοποιούνται για να ξεκινούν στο 1 (σχετικός φθορισμός). Στο παραπάνω διάγραμμα η διαφορά μεταξύ των MST traces του Target και του Complex καλείται εύρος απόκρισης (Response Amplitude). Το εύρος απόκρισης δίνει μια αίσθηση της αλληλεπίδρασης αφού όσο μεγαλύτερο είναι τόσο πιο έντονη αναμένεται να είναι η σύνδεση προσδέτη-πρωτεΐνης. Ο αλγόριθμος του οργάνου επιλέγει δύο σημεία μέτρησης του φθορισμού που φαίνονται ως μπλέ και κόκκινες μπάρες στο παραπάνω διάγραμμα. Το F0 (μπλέ) αντιστοιχεί στη τιμή του φθορισμού των δειγμάτων πριν την ενεργοποίηση του Laser ενώ το F1 (κόκκινο) αντιστοιχεί στην τιμή φθορισμού των δειγμάτων που μετράται στη θερμαινόμενη κατάσταση. Και οι δύο τιμές αποτελούν τους μέσους όρους που λαμβάνονται μεταξύ δύο χρονικών σημείων μέτρησης, ενώ για κάθε ίχνο, η Fnorm υπολογίζεται με τη διαίρεση του F1 με το F0. Ο αλγόριθμος του οργάνου στη συνέχεια μέσω του υπολογισμού της Fnorm των μεμονωμένων ιχνών του target και του complex παρέχει μια σχετική τιμή του εύρους απόκρισης και κατά συνέπεια το μέγεθος της σχετικής αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τη πρωτεΐνη.

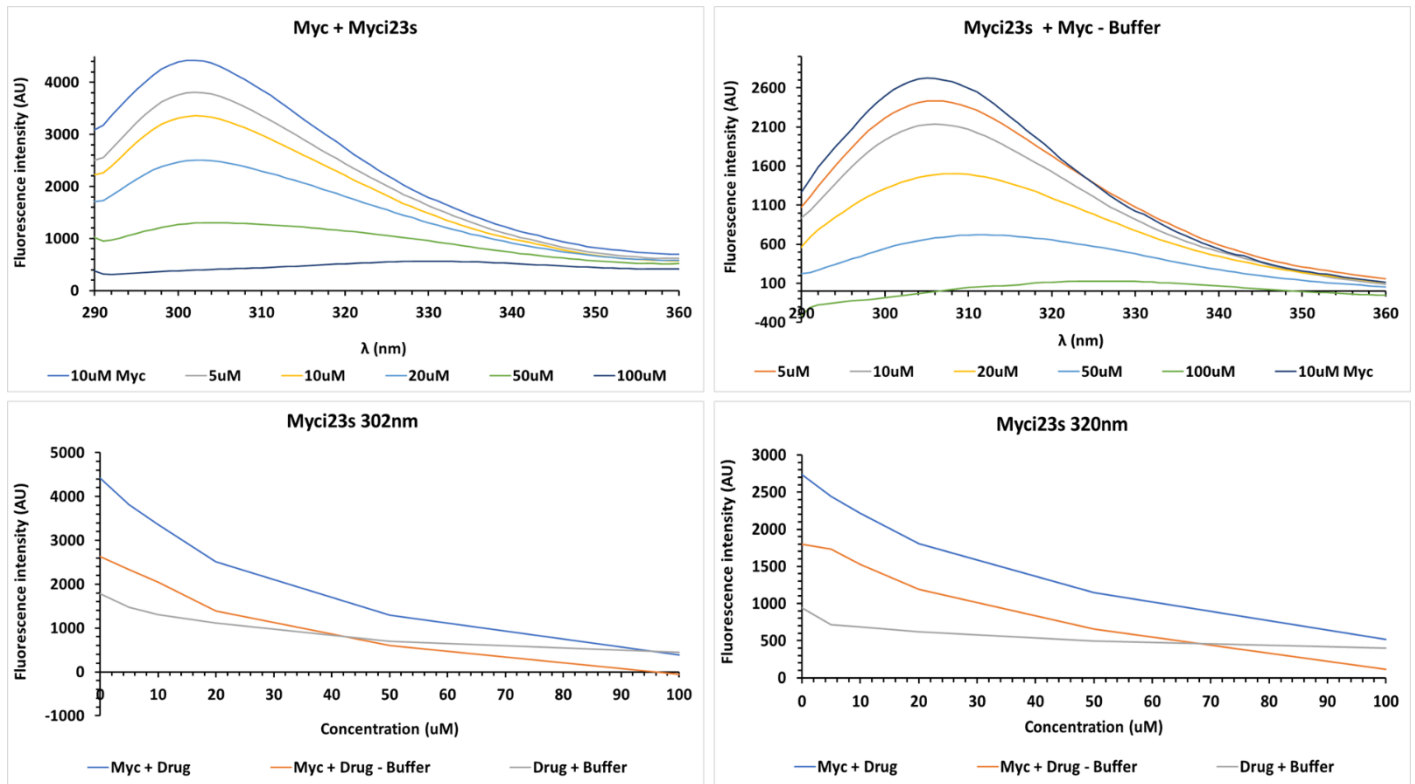
Προκειμένου να λάβουμε μια εικόνα της σχετικής αλληλεπίδρασης των μεμονωμένων ενώσεων με τη Myc αλλά και για να καταστεί δυνατή η σύγκριση των ενώσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με τον F4 (control / αναστολέας της Myc που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τις υπό μελέτη ενώσεις) δημιουργήθηκε το γράφημα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 32**.



**Εικόνα 32:** Γράφημα όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων MST των ενώσεων T226-1216, DP-01941, KM-01958, JPV-00088, SCR00630, PB324795808 σε σχέση με τον γνωστό αναστολέα F4 σε συγκεντρώσεις 5mM. Εξαιρέση αποτελεί η ένωση KM01958 η συγκέντρωση της οποίας ήταν 2.5 mM.

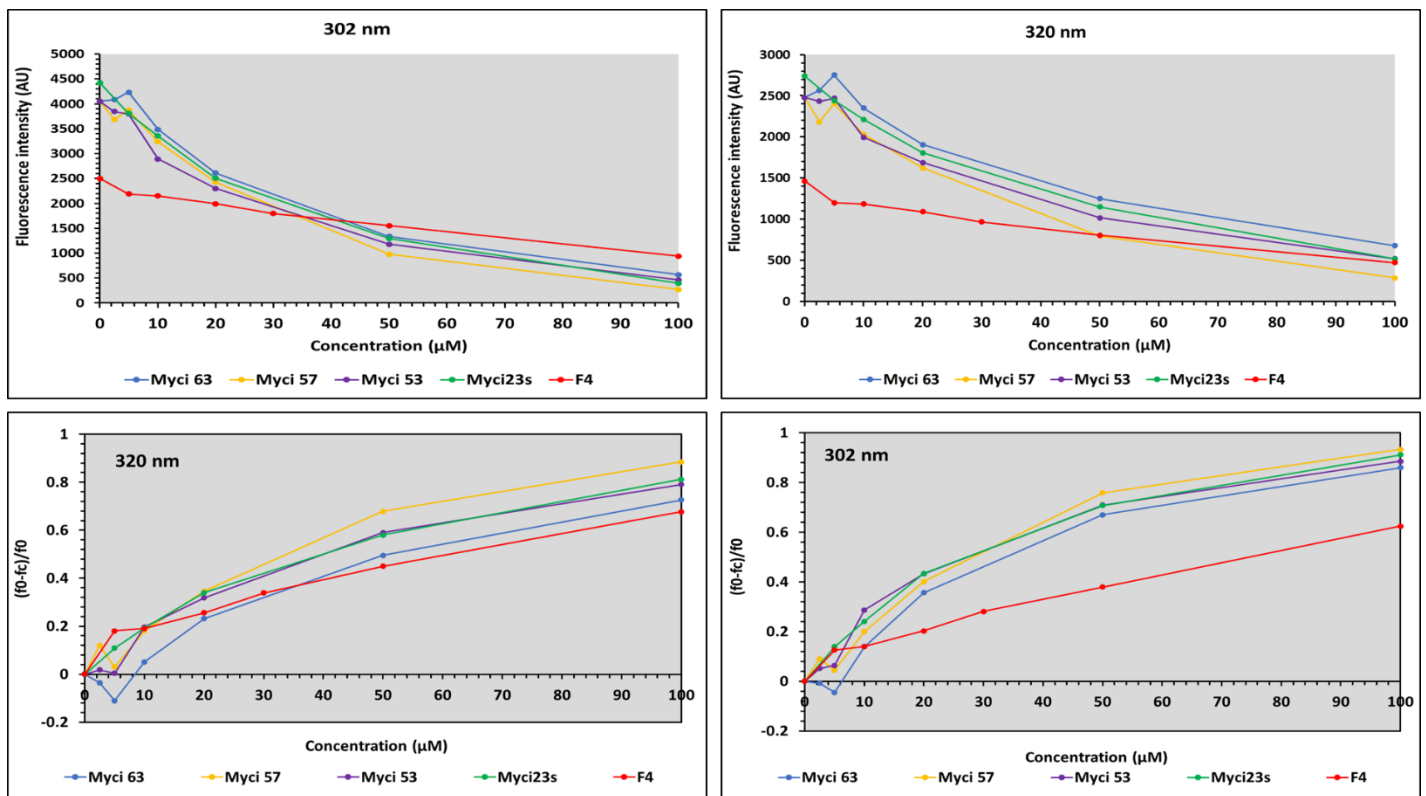
### 3.4 Απόσβεση Φθορισμού για τα ανάλογα του Myci19

Στην **Εικόνα 33** απεικονίζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού για την ένωση Myci23s.



**Εικόνα 33:** Διαγράμματα έντασης φθορισμού – μήκους κύματος (nm) που δείχνουν τη μεταβολή της έντασης του φθορισμού της Myc με σταδιακή προσθήκη του Myci23s, πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου, στα 302 και 320nm. Επίσης παρουσιάζονται διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης στα 302 και 320nm που δείχνουν πως μεταβάλλεται η ένταση του φθορισμού της πρωτεΐνης παρουσία της ένωσης, της πρωτεΐνης παρουσία της ένωσης μετά από αφαίρεση του σήματος υποβάθρου και των δειγμάτων control (που δημιουργούν το σήμα υποβάθρου).

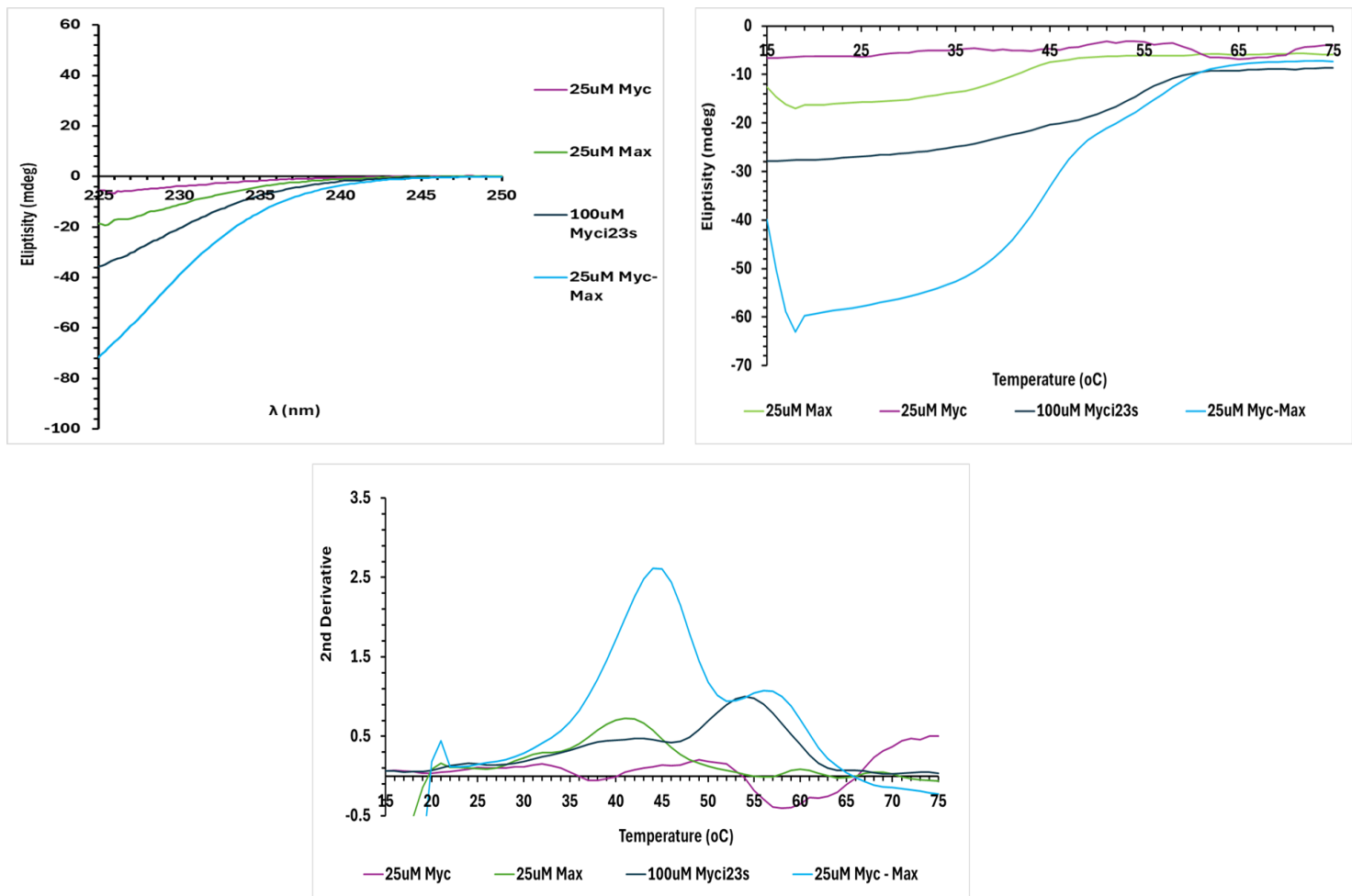
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων απόσβεσης φθορισμού είναι όμοια με τη διαδικασία αξιολόγησης των αναλόγων Amy22. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις των υπό αξιολόγηση ενώσεων -2.5, 5, 10, 20, 30, 50 και 100  $\mu\text{M}$ - σε σχέση με μια σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης Myc (10  $\mu\text{M}$ ) προκειμένου να παρατηρηθεί η απόσβεση φθορισμού από τη σύνδεση των ενώσεων στη Myc. Στο παραπάνω διάγραμμα έντασης φθορισμού-μήκους κύματος παρατηρούμε πως καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του Myci23s η ένταση φθορισμού της Myc φθίνει γεγονός που καταδεικνύει πως η ένωση αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη. Όπως και στη πρώτη κατηγορία φαρμάκων έχει μετρηθεί ο φθορισμός δειγμάτων control (ως δείγματα control και σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν το Buffer με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαρμάκου) και αφαιρέθηκε από τα δείγματα πρωτεΐνης – προσδέτη ώστε να αφαιρεθεί ο φθορισμός υποβάθρου και να παραμείνει ο φθορισμός που οφείλεται στη πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης τόσο στη περίπτωση των 302nm (που είναι το μέγιστο εκπομπής της Tyr) όσο και στα 320nm η καμπύλη που προκύπτει από τη αφαίρεση των control από τα δείγματα πρωτεΐνης που συνεπώαστηκαν με την ένωση δεν διαφέρει αισθητά από την αντίστοιχη των δειγμάτων control. Συνεπώς, η μείωση φθορισμού που παρατηρείται οφείλεται αποκλειστικά στην αλληλεπίδραση συνδέτη-πρωτεΐνης και είναι ανεξάρτητη του φθορισμού υποβάθρου.



**Εικόνα 34:** Διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης και  $f_0 - f_c / f_0$  - συγκέντρωσης των ενώσεων Myci57, Myci63, Myci53, Myci23s και F4 στα 302 και 320nm.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για τις ενώσεις Myci57, Myci63 και Myci53 και ακολούθησε η δημιουργία συνολικών διαγραμμάτων έντασης φθορισμού - συγκέντρωσης στα 302 και 320 nm και  $f_0 - f_c / f_0$  (όπου  $f_0$  : ο αρχικός φθορισμός της ένωσης,  $f_c$  : ο φθορισμός της ένωσης για την αντίστοιχη συγκέντρωση φαρμάκου) - συγκέντρωσης στα ίδια μήκη κύματος, προκειμένου να καταστήσει δυνατή η σύγκριση μεταξύ των ενώσεων. Τα διαγράμματα Myc + Drug - Buffer δεν ήταν δυνατό να δημιουργηθούν καθώς η ποσότητα των φαρμάκων Myci53 και Myci63 δεν επαρκούσε για τη διεξαγωγή των αντίστοιχων πειραμάτων.

### 3.5 Κυκλικός Διχρωσμός για τα ανάλογα του Myci19



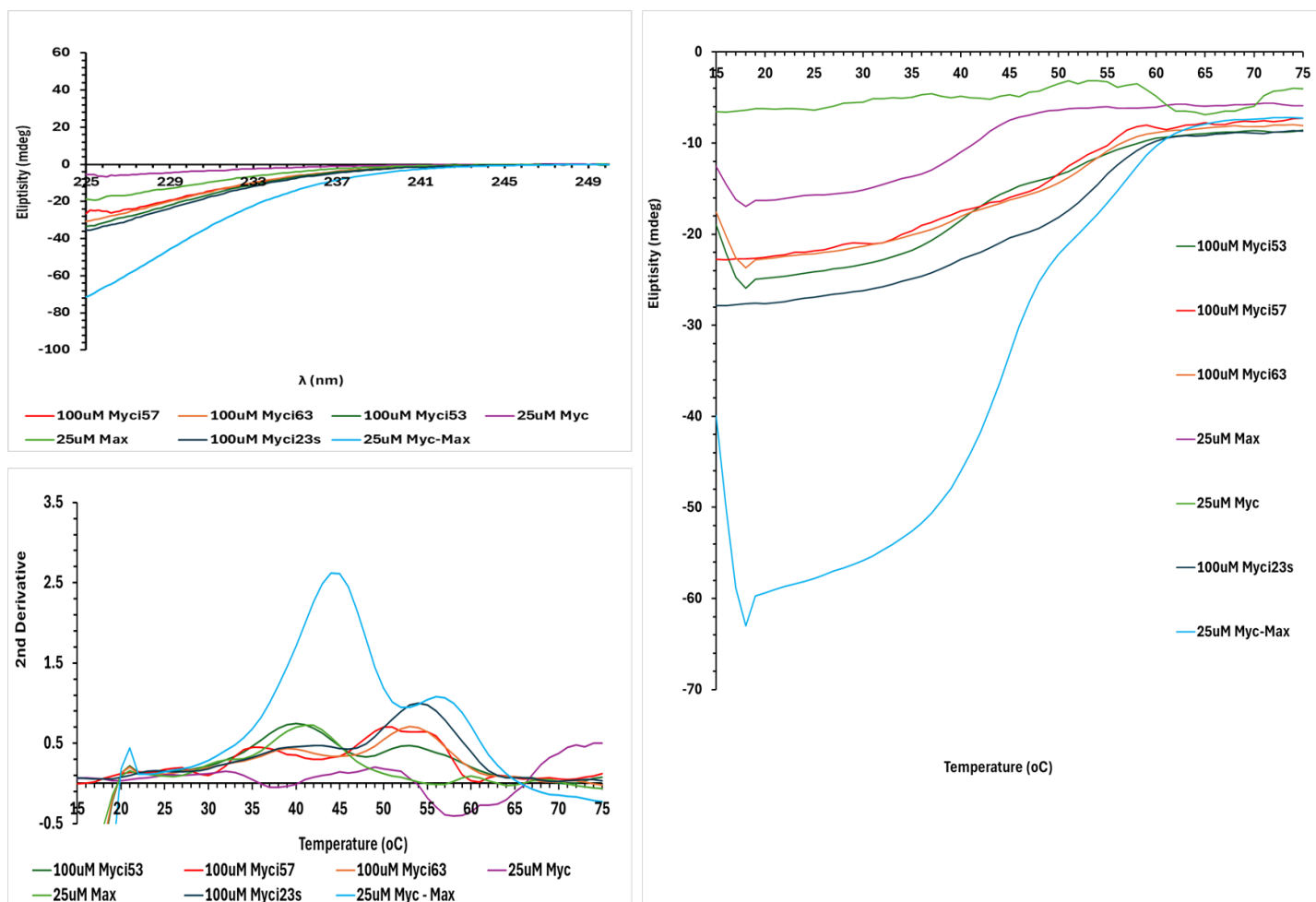
**Εικόνα 35:** Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα διαγράμματα των φασμάτων CD (225-250nm) στους 20 °C (αριστερά), των θερμικών καμπυλών στο εύρος θερμοκρασιών 15°C έως 75°C (πάνω δεξιά) και των δεύτερων παραγώγων των θερμικών καμπυλών στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών (κάτω δεξιά) για την ένωση Myci23s.

Στην **Εικόνα 35** παρουσιάζονται ενδεικτικά τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού των Myc, Max, Myc-Max και Myc-Max + Myci23s. Στο παραπάνω διάγραμμα ελλειπτικότητας (mdeg) – μήκους κύματος (nm) παρατηρούμε όπως και στη προηγούμενη περίπτωση πως η ελλειπτικότητα της Myc είναι ελάχιστη ενώ η ελλειπτικότητα της Max είναι αυξημένη σε σχέση με τη Myc και μικρότερη από την ελλειπτικότητα του ετεροδιμερούς Myc-Max. Η προσθήκη του Myci23s φαίνεται να επηρεάζει τη στερεοδιαμόρφωση του συμπλόκου αφού η ελλειπτικότητα του συμπλόκου παρουσία συνδέτη μειώνεται σε σχέση με το σύμπλοκο χωρίς τη παρουσία της ένωσης.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε η λήψη καμπυλών θερμικής αποδιάταξης στο εύρος θερμοκρασιών 15°C – 75 °C . Για την καλύτερη παρουσίαση των καμπυλών δημιουργήθηκαν διαγράμματα της δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε σχέση με τη θερμοκρασία. Στη περίπτωση της Max έχουμε τη δημιουργία ομοδιμερών και η αποδιάταξη τους σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα συμβαίνει στους 42°C. Στη περίπτωση του συμπλόκου Myc-Max παρατηρούνται δύο κορυφές μια στους 45°C που αντιστοιχεί στην αποδιάταξη του ομοδιμερούς Max-Max και μια στους 57°C που αντιστοιχεί στην αποδιάταξη του ετεροδιμερούς Myc-Max. Παρουσία του Myci23s παρατηρούμε πως αυτές οι κορυφές εμφανίζονται στους 42°C και 54°C αντίστοιχα.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε μια από τις ενώσεις Myci57, Myci63, Myci53 και Myci23s με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαγραμμάτων που περιέχουν τα φάσματα όλων των ενώσεων και τις αντίστοιχες καμπύλες θερμικής αποδιάταξης ώστε να καθίσταται δυνατή η μεταξύ τους σύγκριση αλλά και η σύγκριση τους με το ετεροδιμερές

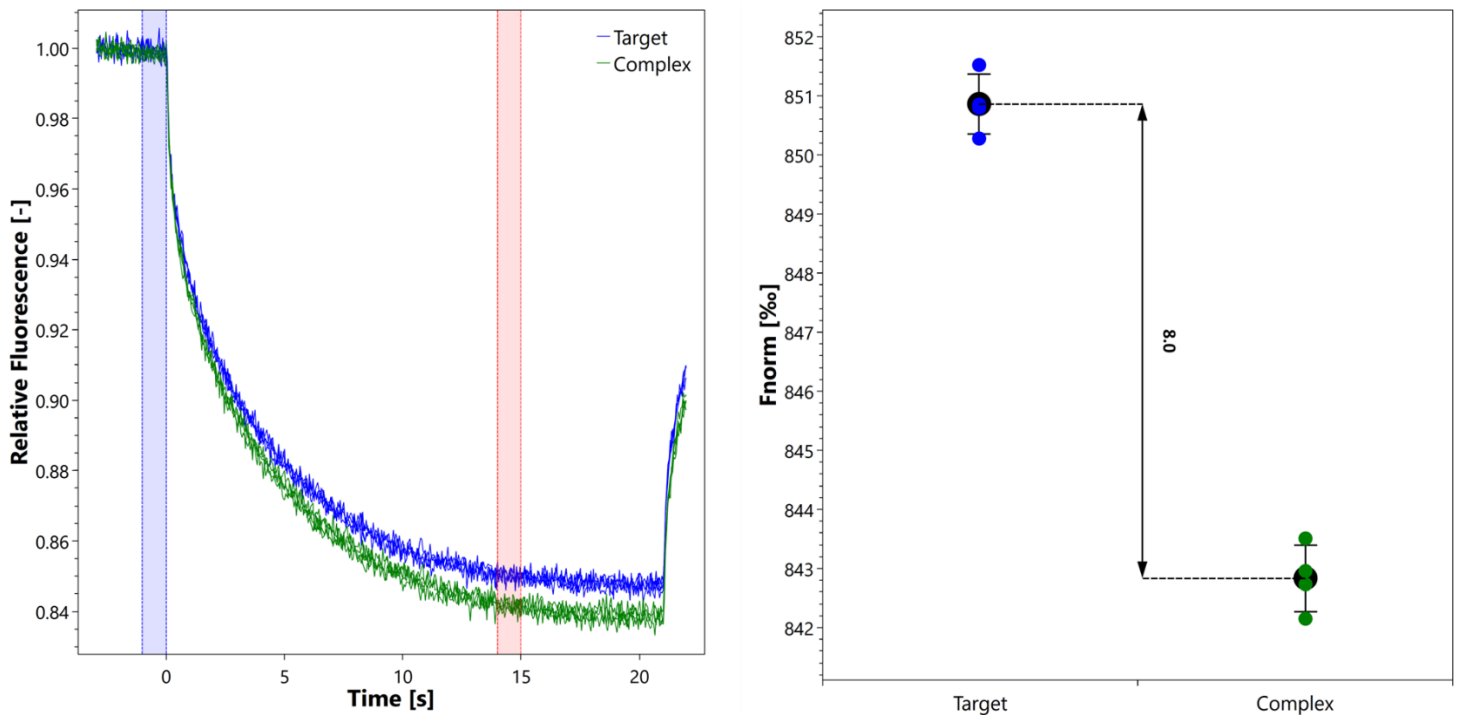
Myc-Max. Τα συνολικά διαγράμματα των φασμάτων CD, των καμπυλών θερμικής αποδιάταξης και της δεύτερης παραγώγου των καμπυλών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 36**.



**Εικόνα 36:** Στη παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται τα συνολικά διαγράμματα των φασμάτων CD (225-250nm) στους 20°C (αριστερά), των θερμικών καμπυλών στο εύρος θερμοκρασιών 15°C έως 75°C (πάνω δεξιά) και των δεύτερων παραγώγων των θερμικών καμπυλών στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών (κάτω δεξιά).



### 3.6 Θερμοφόρηση Μικροκλίμακας για τα ανάλογα του *Myci19*

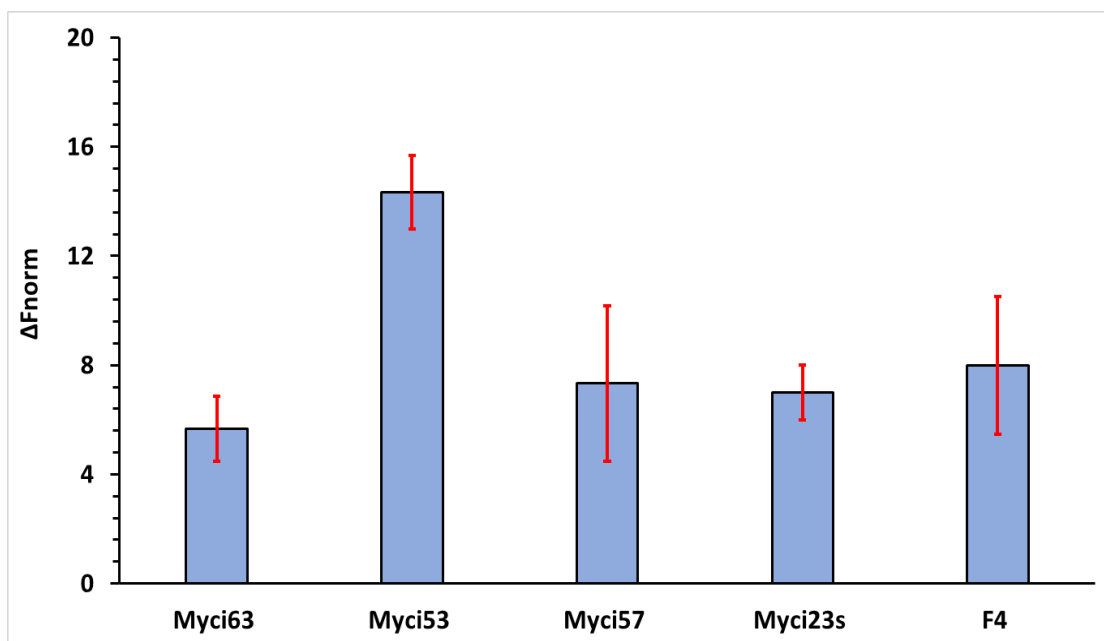


**Εικόνα 37:** Αριστερά παρουσιάζονται τα διαγράμματα Σχετικού Φθορισμού – Χρόνου που περιλαμβάνουν τα ίχνη MST για το σύμπλοκο *Myc* – *Myci23s* (*complex*) και της *Myc* (*target*) καθώς και η μεταξύ τους διαφορά που ονομάζεται εύρος απόκρισης. Δεξιά στο γράφημα των *target* και *complex* σε σχέση με τον *Fnorm* υπολογίζεται μια σχετική τιμή του εύρους απόκρισης.

Όπως και στη πρώτη κατηγορία ενώσεων έγιναν πειράματα MST για να προσδιοριστεί ποιοτικά η αλληλεπίδραση με τη *Myc*. Στο πρωτόκολλο Binding check που ακολουθήθηκε χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση φθορίζουσας πρωτεΐνης 25 nM και συγκέντρωση συνδέτη 0.5 mM. Παραπάνω παρουσιάζονται ενδεικτικά πως μεταβάλλονται τα ίχνη MST του συμπλόκου *Myci23s*-*Myc* σε σχέση με τη πρωτεΐνη ενώ μέσω του υπολογισμού της *Fnorm* των μεμονωμένων ιχνών του *target* και του *complex* παρέχεται μια σχετική τιμή του εύρους απόκρισης και κατά συνέπεια το μέγεθος της σχετικής αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τη πρωτεΐνη (**Εικόνα 37**).

Προκειμένου να ληφθεί μια εικόνα της σχετικής αλληλεπίδρασης των μεμονωμένων ενώσεων με τη *Myc* αλλά και για να καταστεί δυνατή η σύγκριση των ενώσεων τόσο μεταξύ τους όσο και με τον F4 (control / αναστολέας της *Myc*) δημιουργήθηκε γράφημα που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 38**.





**Εικόνα 38:** Γράφημα όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων MST των ενώσεων Myci53, 57,63 και Myci23s σε σχέση με την ένωση F4.

## **Τέταρτο κεφάλαιο: Συζήτηση**

Ο καρκίνος είναι μια από τις πιο τρομακτικές ασθένειες του 20ου αιώνα και εξαπλώνεται περαιτέρω με συνεχή και αυξανόμενη συχνότητα στον 21ο αιώνα. Η κατάσταση είναι τόσο ανησυχητική που ένα στα τέσσερα άτομα διατρέχει κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου τουλάχιστον μια φορά στη ζωή του (Roy & Saikia, 2016). Ο καρκίνος σχετίζεται με τη συσσώρευση πολλών γονιδιακών μεταλλάξεων που σταδιακά κατευθύνουν την ανάπτυξη ογκογόνων χαρακτηριστικών που διαμορφώνουν μια ιδιαίτερα σύνθετη βιολογία. Για το λόγο αυτό πολλοί τύποι καρκίνου που δεν ανιχνεύονται έγκαιρα, δεν είναι ιάσιμοι και οδηγούν σε θάνατο. Ωστόσο, η πρόοδος στη θεραπεία του καρκίνου έχει επιφέρει σημαντική αύξηση του προσδόκιμου και βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών. Η πολυδιάστατη φύση του ωστόσο, καθιστά δύσκολη την εύρεση βιολογικών στόχων που ο αποκλεισμός τους, θα επηρέαζε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου. Βέβαια, η βασική έρευνα της βιολογίας του καρκίνου έχει αναδείξει ορισμένα μόρια <<κλειδιά>> που η αναστολή τους, θα μπορούσε δυνητικά να ανακόψει την εξέλιξη του καρκίνου. Μια από τις πρωτεΐνες που ξεχωρίζουν για τον κεντρικό τους ρόλο στην προώθηση της νόσου είναι η Myc.

Η πρωτεΐνη Myc, αποτελεί κύριο ρυθμιστή πολλών κυτταρικών λειτουργιών όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Αν και η ρύθμιση της έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης είναι πολυεπίπεδη, σε περιπτώσεις απορρύθμισης -συνήα μέσω υπερέκφρασης ή μεταλλάξεων που σχετίζονται με την αύξηση της σταθερότητάς της- καθοδηγεί την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου. Η σχέση της Myc με την καρκινογένεση είναι πολυδιάστατη αφού εκτός του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού, το συγκεκριμένο ογκογονίδιο σχετίζεται και με πλήθος άλλων κυτταρικών διεργασιών όπως την ενίσχυση της αγγειογένεσης, τη διατάραξη του φυσιολογικού κυτταρικού κύκλου, την αποφυγή της απόπτωσης, που στην ολόκληρη τους προωθούν την ανάπτυξη του όγκου.

Η Myc σχετίζεται με πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση της έκφρασης του 35% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Όπως, έχει γίνει ήδη κατανοητό «όλοι οι δρόμοι οδηγούν στη Ρώμη» καθώς έμμεσα ή άμεσα η πλειοψηφία των κυτταρικών διεργασιών ρυθμίζεται από τη Myc. Δεδομένου του κεντρικού ρόλου της στη βιολογία του καρκίνου, η εν λόγω ογκοπρωτεΐνη έχει αναδειχθεί ως ένας στόχος υψηλής θεραπευτικής αξίας.

Ωστόσο, η εγγενώς αδόμητη φύση της πρωτεΐνης, αποτελεί μια πολύ μεγάλη πρόκληση στην αποτελεσματική καταστολή της αφού αφενός αποκλείει την στόχευση αποτελεσματικών θυλάκων στην επιφάνειά της, αφετέρου καθιστά δύσκολο τον χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεών της με άλλους συνδέτες. Μάλιστα, το πρόβλημα στόχευσης μια τέτοιας πρωτεΐνης ήταν τόσο πολύπλοκο που για πολλά χρόνια ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας θεωρούνταν «undruggable». Ωστόσο, νέα δεδομένα που προέκυψαν από φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες διαλεύκαναν τη δομική διάταξη της Myc και αποτέλεσαν εφελτήριο για την ανάπτυξη λειτουργικών αναστολέων (Karadkhelkar et al., 2023).

Η μακροχρόνια έρευνα πάνω στην αναστολή της Myc απέδωσε ποικίλες στρατηγικές στόχευσης που κυμαίνονται σε όλο το εύρος των μηχανισμών ρύθμισης από την έκφραση του γονιδίου μέχρι την μετάφραση της πρωτεΐνης. Αυτό το σύνολο των στρατηγικών χαρακτηρίζονται ως έμμεσο διότι δεν στοχεύει τη πρωτεΐνη αλλά άλλους παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση της. Ωστόσο, οι σύγχρονες ερευνητικές προσπάθειες εστιάζοντας στην αναστολή του ετεροδιμερισμού της Myc με τη Max ή στην αποτροπή της σύνδεσης του ετεροδιμερούς στο DNA ανέπτυξαν ένα σύνολο άμεσων στρατηγικών στόχευσης. Η άμεση στόχευση περιλαμβάνει πολλά είδη μορίων που κυμαίνονται από πολυπεπίδια έως μικρά οργανικά μόρια και απταμερή. Η συγκεκριμένη, διπλωματική εστιάζει στη ποιοτική in vitro αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης μικρών οργανικών μορίων που έχουν σχεδιαστεί για να

αποδιατάσσουν το ετεροδιμερές Myc-Max και αξιολογούνται με διάφορες μεθοδολογίες από συνεργαζόμενες ερευνητικές ομάδες.

Η αξιολόγηση αυτών των ενώσεων κατέστη δυνατή με τη χρήση τριών βιοφυσικών τεχνικών τη θερμοφύρωση μικροκλίμακας, το κυκλικό διχρωισμό και την απόσβεση φθορισμού. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τις ποιοτικής αξιολόγησης δύο κατηγοριών ενώσεων, των ενώσεων που δημιουργήθηκαν μέσω μοριακών προσομοιώσεων στο εργαστήριο της Δρ. Κούρνια και αποτελούν ανάλογα της ένωσης Amy22 και των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν μέσω υπολογισμών φαρμακομοιότητας στο εργαστήριο του Δρ. Ζωΐδη και αποτελούν ανάλογα της ένωσης Myc19.

Αναφορικά με τις ενώσεις της ομάδας Κούρνια πραγματοποιήθηκαν πειράματα MST, CD και φθορισμού για κάθε ένωση ξεχωριστά και έπειτα δημιουργήθηκαν τα συνολικά διαγράμματα για κάθε τεχνική ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ των ενώσεων.

Τα πειράματα MST Binding check οδήγησαν στη δημιουργία γραφημάτων σαν αυτό της **Εικόνας 32** από τα οποία προκύπτει ότι η μεγαλύτερη μεταβολή στις ιδιότητες της πρωτεΐνης Myc σχετίζεται με μεγαλύτερη πιθανότητα πρόσδεσης. Η μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης αποδίδεται στην ένωση PB324795808 και ακολουθούν κατά σειρά μειούμενης, αλλά πολύ παρόμοιας ικανότητας πρόσδεσης οι ενώσεις T226-1216, DP-01941, KM-01958, SCR00630 & JPV00088. Όλες σχεδόν οι ενώσεις φαίνεται να έχουν παρόμοια ή και μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσδεσης από την ένωση F4, που θεωρείται “golden standard” για πρόσδεση στη Myc και διατάραξη της αλληλεπίδρασής της με τη Max.

Τα πειράματα CD των μεμονωμένων φαρμάκων χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ενός διαγράμματος ελλειπτικότητας – μήκους κύματος (nm) (**Εικόνα 29**) που με τη σειρά της αντανακλά το ποσοστό α-έλικας, άρα και το σχηματισμό ετεροδιμερούς Myc-Max. Με βάση τις μεταβολές της ελλειπτικότητας στα 225nm που προκαλεί η προσθήκη των ενώσεων στο διμερές φαίνεται πως οι ενώσεις επηρεάζουν ελάχιστα έως καθόλου το σχηματισμό ετεροδιμερούς Myc-Max παρουσία φαρμάκου σε σχέση με το ετεροδιμερές απουσία κάποιου συνδέτη. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στο πίνακα που ακολουθεί στον οποίο έχουν περιληφθεί αντίστοιχα αποτελέσματα για την ένωση VM18 η οποία έχει βρεθεί να αποσταθεροποιεί σημαντικά την α-έλικα του ετεροδιμερούς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και αδημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας μας (Ε. Βάσση). Από τα φάσματα των ενώσεων προσδιορίστηκε η ελλειπτικότητα του ετεροδιμερούς παρουσία και απουσία φαρμάκου στα 222nm (ενδεικτική για την παρουσία α-έλικας) και έπειτα υπολογίστηκε ο λόγος  $Elipcticity_{Myc-Max} - Elipcticity_{Myc-Max+Drug} / Elipcticity_{Myc-Max}$  (E1 -E2 / E1) που δείχνει τη μεταβολή του φάσματος του ετεροδιμερούς παρουσία φαρμάκου σε σχέση με το δείγμα control. Η τιμή του λόγου E1 -E2 / E1 πολλαπλασιάστηκε επί 100% για να ληφθεί η ποσοστιαία μεταβολή. Οι τιμές του λόγου E1 -E2/E1 που είναι θετικές δείχνουν ότι το σύμπλοκο Myc-Max+Drug έχει χαμηλότερο ποσοστό α-έλικας σε σχέση με το ετεροδιμερές ενώ για τις αρνητικές τιμές ισχύει το αντίθετο. Η μείωση του ποσοστού α-έλικας του ετεροδιμερούς παρουσία φαρμάκου αποτελεί ένδειξη αποσταθεροποίησης. Επιπλέον, πρέπει να επισημανθεί πως μεταβολές έως 5% αποδίδονται σε πειραματικούς χειρισμούς και δεν μπορούν να αξιολογηθούν ως σημαντικές.

Drug	Elipcticity Myc-Max (E1)	Elipcticity Myc-Max + Drug (E2)	(E1 - E2) / E1 (%)
25uM myc 25uM max 50uM VM18	-37.5	-29.1	22.3
10uM myc 10 uM max 100uM T226-1216	-16.4	-15.7	4.1
10uM myc 10 uM max 500uM T226-1216	-16.4	-16.5	-1.0
10uM myc 10uM max 20uM SCR00630	-14.9	-14	5.6
10uM myc 10uM max 100uM SCR00630	-14.9	-14.5	2.3

25uM myc 25uM max 500uM SCR00630SC	-37.5	-44.4	-18.2
25uM myc 25uM max - 50uM SCR00630SC	-51.8	-52	-0.4
10uM myc 10uM max 50uM DP01491	-14.9	-14.2	4.3
10uM myc 10uM max 250uM DP01491	-14.9	-13.6	8.9
10uM myc 10uM max 50uM JPV00088	-14.9	-15.2	-2.1
10uM myc 10uM max 250uM JPV00088	-14.9	-15.5	-4.3
10uM myc 10 uM max 25uM PB324795808	-16.4	-17.2	-5.1

Με βάση τα παραπάνω φαίνεται πως η ένωση VM18 διαταράσσει εντονότερα το ετεροδιμερές επιφέροντας μείωση της ελλειπτικότητας περίπου 22% σε σχέση με το control. Η ένωση DP01491 φαίνεται να αποσταθεροποιεί το ετεροδιμερές με αύξηση της συγκέντρωσης της σε σχέση με το Myc-Max αφού από αναλογία 1:5 σε αναλογία 1:25 το ποσοστό μείωσης της ελλειπτικότητας σχεδόν διπλασιάζεται. Στις περιπτώσεις των ενώσεων T226-1216 (αναλογίες 1:10 και 1:50), JPV00088 (αναλογίες 1:5 και 1:25) και PB324795808 (αναλογία 1:2,5) δεν υφίσταται κάποια ανιχνεύσιμη αλλαγή του ποσοστού α-έλικας σε σχέση με το ετεροδιμερές. Η ένωση SCR00630 σε αναλογίες μικρότερες των 1:20 φαίνεται πως δεν επηρεάζει το ετεροδιμερές. Ωστόσο, σε αναλογία 1:20 φαίνεται πως η ένωση σταθεροποιεί το ετεροδιμερές, αφού το ποσοστό α-έλικας αυξάνει σε σχέση με το control. Η επίδραση της SCR00630 χρήζει περαιτέρω έρευνας προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης με το ετεροδιμερές.

Επιπρόσθετα, η λήψη θερμικών καμπυλών στο θερμοκρασιακό εύρος 15°C έως 75°C χρησιμοποιήθηκε στη δημιουργία διαγραμμάτων δεύτερης παραγώγου ελλειπτικότητας – θερμοκρασίας για τη καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων (**Εικόνα 29**). Στα διαγράμματα δεύτερης παραγώγου υφίστανται δύο κορυφές, η πρώτη αντιστοιχεί στην αποδιάταξη των ομοδιμερών Max-Max ενώ η δεύτερη αντιστοιχεί στην αποδιάταξη των ετεροδιμερών Myc-Max. Αξίζει να σημειωθεί πως το μέγεθος των καμπυλών είναι σχετικό και δεν μπορεί να συσχετιστεί απόλυτα με την ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού ομοδιμερών σε σχέση με τα ετεροδιμερή στο διάλυμα. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να εξαχθεί ασφαλώς από αυτά τα διαγράμματα είναι πως σε όλα τα διαλύματα Myc-Max-φαρμάκων καθώς και στο control (Myc-Max χωρίς τη παρουσία κάποιου φαρμάκου) υφίστανται τόσο ετεροδιμερή Myc-Max όσο και ομοδιμερή Max-Max. Εξαιρέσεις αποτελούν το διάγραμμα της Myc όπου δεν αναμένονται χαρακτηριστικές κορυφές λόγω έλλειψης σχηματισμού ομοδιμερών και το διάγραμμα της Max όπου εμφανίζεται μόνο μια κορυφή που αντιστοιχεί στα ομοδιμερή Max-Max. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω της δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας κατέστησε δυνατή την εύρεση των σχετικών θερμοκρασιών αποδιάταξης των διμερών Max-Max και Myc-Max παρουσία και απουσία συνδέτη που παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Θερμική Αποδιάταξη		
	Βήμα 1 (T <sub>m</sub> / °C)	Βήμα 2 (T <sub>m</sub> / °C)
Myc	-	-
Max	42	-
Myc-Max	45	57
T226-1216	44	57
DP-01941	43	56
KM-01958	44	56
JPV-00088	43	55
SCR00630	44	57
PB324795808	44	56

Σύμφωνα, με τον παραπάνω πίνακα το ομοδιμερές Max-Max αποδιατάσσεται στους 42°C ενώ το ετεροδιμερές Myc-Max αποδιατάσσεται στους 57°C γεγονός που είναι αναμενόμενο καθώς τα ετεροδιμερή Myc-Max είναι αρκετά πιο σταθερά από τα αντίστοιχα ομοδιμερή Max-Max. Επιπλέον, είναι αναμενόμενη η έλλειψη χαρακτηριστικών κορυφών αποδιάταξης στη περίπτωση της Myc καθότι υπό φυσιολογικές συνθήκες δε δημιουργούνται ομοδιμερή ούτε σημαντικό ποσοστό α-έλικας. Επειδή οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των διμερών παρουσιάζουν κάποια μικρή διακύμανση ανάμεσα στις μετρήσεις μπορεί να οριστεί ένα σχετικό θερμοκρασιακό εύρος αποδιάταξης που για τα ομοδιμερή Max-Max κυμαίνεται από 42-45°C, ενώ για τα ετεροδιμερή Myc-Max από 55-57°C.

Συνακόλουθα, οι σχετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης των διμερών μετά τη προσθήκη κάποιου συνδέτη, φαίνεται πως συγκλίνουν στο σχετικό θερμοκρασιακό τους εύρος. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει πως κανένα από τα παραπάνω φάρμακα δεν φαίνεται να ασκεί τόσο ισχυρή επίδραση ώστε να μεταβάλλει τη θερμοκρασία αποδιάταξης του Myc-Max. Ωστόσο, στο διάγραμμα της δεύτερης παραγωγού φαίνεται πως η ένταση της κορυφής μειώνεται με την παρουσία των ενώσεων. Αξίζει επίσης, να σημειωθεί πως η επίδραση των φαρμάκων στο ομοδιμερές Max-Max είναι ελάχιστη έως μηδενική.

Καταληκτικά, οι ενώσεις δεν μεταβάλλουν αισθητά τη θερμοκρασία αποδιάταξης του ετεροδιμερούς Myc-Max. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η δυσδιαλυτότητα των ενώσεων αυτών σε υδατικά διαλύματα δεν επιτρέπει τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων, άρα και μεγάλης περιόσεως σε σχέση με την πρωτεΐνη. Η τελική συγκέντρωση των φαρμάκων στις μετρήσεις ήταν κατά κανόνα 100  $\mu\text{M}$  ενώ η τελική συγκέντρωση τους διμερούς ήταν 25  $\mu\text{M}$ . Δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα η προσθήκη υψηλότερων συγκεντρώσεων φαρμάκου να επέφερε κάποια ανιχνεύσιμη αποσταθεροποίηση του ετεροδιμερούς. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η σύγκλιση των αποτελεσμάτων στη λήψη φασμάτων CD σε DMSO και EtOH, υποδεικνύει πως οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες δεν επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ Myc-Max και συνδέτη.

Με βάση τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού για τη κάθε ένωση δημιουργήθηκαν διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης στα 302 και 320 nm πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου (φθορισμός που οφείλεται στα συστατικά του Buffer και τη δομή της ένωσης). Αρχικά όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 26** οι διαφορές στις εντάσεις φθορισμού των ενώσεων στα 302 nm πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου είναι μικρές γεγονός που καταδεικνύει πως η μείωση της έντασης του φθορισμού οφείλεται στην πρόσδεση των ενώσεων στη bHLHLZ της Myc και όχι στην επίδραση άλλων συστατικών του διαλύματος. Ωστόσο, σχετικά μεγαλύτερες αποκλείσεις παρατηρούνται στα αντίστοιχα διαγράμματα στα 320nm. Η αυξημένη ένταση του φθορισμού στο διάγραμμα που δεν έχει αφαιρεθεί ο φθορισμός υποβάθρου πιθανώς οφείλεται στη δομή της ένωσης καθώς τα μέγιστα φθορισμού των ενώσεων είναι κοντά σε αυτή τη περιοχή και συμβάλλουν στην ένταση φθορισμού σε αυτό το μήκος κύματος.

Εστιάζοντας στα διαγράμματα όπου έχει αφαιρεθεί η ένταση φθορισμού παρατηρείται τόσο στα 302 nm όσο και στα 320 nm πως όλες οι ενώσεις καταφέρνουν να μειώσουν τον εγγενή φθορισμό της Myc και πως η μείωση αυτή εντείνεται καθώς αυξάνει η συγκέντρωση της ένωσης. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια απόδειξη πως οι ενώσεις αλληλεπιδρούν με τη Myc.

Στη συνέχεια για λόγους συγκριτικής αναπαράστασης των αποτελεσμάτων, η ένταση φθορισμού χρησιμοποιήθηκε σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης προστιθέμενου φαρμάκου για τη κατασκευή διαγραμμάτων  $f_0 - f_c / f_0$  – συγκέντρωσης στα 302 nm και στα 320 nm, πριν και μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου, όπου περιέχονται οι καμπύλες όλων των

φαρμάκων που μελετήθηκαν. Για τους λόγους που εξηγήθηκαν παραπάνω, επειδή κάποιες από τις ενώσεις εκπέμπουν σε κοντινά με τα 320nm μήκη κύματος, η σύγκριση μεταξύ όλων των φαρμάκων είναι πιο αξιόπιστη στις καμπύλες που αναφέρονται στα 302nm.

Στα διαγράμματα της  $fo-fc/fo$  – συγκέντρωσης στα 302 nm και στα 320 nm, μετά την αφαίρεση του φθορισμού υποβάθρου της **Εικόνας 27** μπορεί να παρατηρηθεί πως η συγκέντρωση του προσδέτη μεταβάλλει τον εγγενή φθορισμό της Myc. Επιπλέον, η ικανότητα κάθε ένωσης να μειώνει την ένταση του φθορισμού της Myc συγκρίνεται με την ικανότητα του αναστολέα F4.

Σύμφωνα λοιπόν με το διάγραμμα της **Εικόνας 27** στα 302 nm φαίνεται πως το DP01491 μειώνει σε μεγαλύτερο βαθμό την ένταση φθορισμού της Myc τόσο σε σχέση με το F4 όσο και σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Ακολουθεί η ένωση PB324795808 που μειώνει επίσης την ένταση του φθορισμού σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το F4 ενώ σε όλες τις υπόλοιπες ενώσεις ο φθορισμός μειώνεται σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με το F4. Βέβαια, επειδή οι αποκλείσεις των καμπυλών τιτλοδότησης μεταξύ των ενώσεων είναι μικρές το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί με ασφάλεια είναι πως όλες οι ενώσεις διαθέτουν ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη περιοχή bHLHLZ της πρωτεΐνης. Μεταξύ των ενώσεων, οι DP0491 και δευτερευόντως η PB324795808 φαίνεται πως αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τη Myc. Όλες οι άλλες ενώσεις ακολουθούν με μικρές αποκλίσεις τη συμπεριφορά του F4.

Στη δεύτερη κατηγορία ενώσεων που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν με βάση το Myc19 από το εργαστήριο του Δρ. Ζωΐδη πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα MST, CD και φθορισμού για κάθε ένωση ξεχωριστά και έπειτα δημιουργήθηκαν τα συνολικά διαγράμματα για κάθε τεχνική κατ' αντιστοιχία με τη πρώτη κατηγορία ενώσεων.

Μέσω πειραμάτων MST Binding check δημιουργήθηκε το γράφημα της **Εικόνας 38** για τις ενώσεις Myc153,63,57&23s. Σύμφωνα, με το γράφημα η πιο ισχυρή ικανότητα αλληλεπίδρασης αποδίδεται στην ένωση Myc153 και ακολουθούν κατά σειρά μειούμενης ικανότητας πρόσδεσης οι ενώσεις Myc157, Myc123s και Myc163. Και σε αυτή τη περίπτωση όλες σχεδόν οι ενώσεις φαίνεται να έχουν παρόμοια ή και μεγαλύτερη δυνατότητα πρόσδεσης από την ένωση F4, για πρόσδεση στη Myc και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ικανότητα διατάραξης του ετεροδιμερούς της με τη Max.

Στην **Εικόνα 36** παρουσιάζεται το διάγραμμα που περιέχει όλα τα φάσματα CD των φαρμάκων Myc153,63,57 & 23s. Βάσει του παραπάνω διαγράμματος φαίνεται πως όλα τα φάρμακα διαταράσσουν τη σταθερότητα του ετεροδιμερούς Myc-Max σε σχέση με το ετεροδιμερές χωρίς τη παρουσία κάποιου συνδέτη. Αυτό υπογραμμίζεται από την απόκλιση στην ελλειπτικότητα άρα και στην  $\alpha$ -έλικα στα 225nm. Μεταξύ των φαρμάκων το Myc157 φαίνεται πως αποσταθεροποιεί περισσότερο το σύμπλοκο Myc-Max σε σχέση με τα Myc163 & 53. Επίσης και τα τρία μόρια εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αποδιάταξης του ετεροδιμερούς σε σχέση με το Myc123s.

Τα παραπάνω συμπεράσματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί. Ο πίνακας αυτός περιέχει τους λόγους  $\text{Elipticity}_{\text{Myc-Max}} - \text{Elipticity}_{\text{Myc-Max+Drug}} / \text{Elipticity}_{\text{Myc-Max}}$  (E1 -E2 / E1) των ενώσεων Myc153, 63, 57 & 23s σε σχέση με τον αναστολέα VM-18 στα 225nm.

Drug	Elipticity Myc-Max (E1)	Elipticity Myc-Max + Drug (E2)	(E1 - E2) / E1 (%)
25uM myc 25uM max 50uM VM18	-28.4	-22.3	21.4
25uM myc 25uM max - 100uM Myc153	-71.4	-33.3	53.2
25uM myc 25uM max - 100uM Myc157	-71.4	-26.4	63
25uM myc 25uM max - 100uM Myc163	-71.4	-30.6	57.1
25uM myc 25uM max - 100uM Myc123s	-71.4	-35.5	50.2

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως η ένωση Myci57 διαταράσσει εντονότερα το ετεροδιμερές επιφέροντας μείωση της ελλειπτικότητας περίπου 63% σε σχέση με το control. Τη συμπεριφορά του Myci57 ακολουθούν οι ενώσεις Myci63 με ποσοστό 57.1%, Myci53 με ποσοστό 53.2% και Myci23s με ποσοστό 50.2%. Βάσει του παραπάνω πίνακα αποδεικνύεται πως όλες οι ενώσεις της σειράς Myci διαταράσσουν έντονα το ετεροδιμερές Myc-Max και είναι πολύ πιο ισχυρές από τον αναστολέα VM-18. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι αρκετά δυσδιάλυτες σε EtOH και για τον λόγο αυτό δεν ήταν δυνατή η λήψη των αντίστοιχων φασμάτων.

Για τα μόρια Myci57,63,53 και 23s ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη πρώτη κατηγορία μορίων για την καταγραφή καμπυλών θερμικής αποδιάταξης (15-75°C) και τη δημιουργία διαγραμμάτων δεύτερης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε σχέση με τη θερμοκρασία. Σε αυτή την περίπτωση υπήρξε διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών αποδιάταξης των ετεροδιμερών μετά τη προσθήκη συνδέτη σε σχέση με το control (ετεροδιμερές απουσία συνδέτη). Η μεγαλύτερη θερμοκρασιακή διαφορά σημειώθηκε στη περίπτωση του Myci57 και ήταν 6 °C ενώ για τις ενώσεις Myci63, 53, 23s ήταν 4, 4 και 3°C αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε επίσης διαφορά στις θερμοκρασίες αποδιάταξης των ομοδιμερών Max παρουσία συνδέτη. Για το Myci57 η διαφορά ήταν 9 °C ενώ για τα Myci63, 53, 23s ήταν 6, 5 και 3°C αντίστοιχα.

Θερμική Αποδιάταξη		
	Βήμα 1 (T <sub>m</sub> /°C)	Βήμα 2 (T <sub>m</sub> /°C)
Myc	-	-
Max	42	-
Myc-Max	45	57
Myci57	36	51
Myci53	40	53
Myci63	39	53
Myci23s	42	54

Σύμφωνα με το διάγραμμα της δεύτερης παραγώγου σε σχέση με τη θερμοκρασία της **Εικόνας 36** φαίνεται πως τα μόρια Myci57,63,53 και 23s αποδιατάσσουν έντονα το ετεροδιμερές Myc-Max μειώνοντας όχι μόνο την ένταση της δεύτερης κορυφής σε σχέση με το δείγμα control αλλά και μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία αποδιάταξης του ετεροδιμερούς. Συνολικά το μόριο το οποίο αποδιατάσσει περισσότερο το ετεροδιμερές Myc-Max φαίνεται να είναι το Myci57 που δημιουργεί τη μεγαλύτερη θερμοκρασιακή διαφορά ενώ τα Myci53, 63 και 23s ακολουθούν με μικρές αποκλίσεις τη συμπεριφορά του. Ωστόσο, όλες οι ενώσεις που προαναφέρθηκαν αποδιατάσσουν το ετεροδιμερές σε μικρότερες θερμοκρασίες και μειώνουν την ένταση της δεύτερης κορυφής (στο διάγραμμα της δεύτερης παραγώγου). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι νέοι αναστολείς εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αποδιάταξης του Myc-Max. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη τη θερμοκρασιακή διαφορά των ομοδιμερών Max-Max (πρώτη κορυφή στα διαγράμματα της δεύτερης παραγώγου) ανάμεσα στη καμπύλη του ετεροδιμερούς απουσία συνδέτη και στις καμπύλες του ετεροδιμερούς παρουσία συνδέτη παρατηρούμε πως όλες οι ενώσεις διαταράσσουν και το ομοδιμερές Max-Max. Το γεγονός αυτό πιθανώς να υποδεικνύει πως οι ενώσεις εκτός από τη Myc αλληλεπιδρούν και με τη Max. Ωστόσο η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης για να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα της.

Με βάση τα πειράματα φθορισμού για τη κάθε ένωση δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα έντασης φθορισμού – συγκέντρωσης στα 302 και 320 nm. Για τη κατηγορία των φαρμάκων αυτών δεν κατέστη δυνατή η λήψη φασμάτων για τα δείγματα με Buffer + αυξανόμενες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη μορίου λόγω ανεπάρκειας της ποσότητας των φαρμάκων Myci63 και Myci53.



Εστιάζοντας λοιπόν στα γραφήματα της έντασης φθορισμού της **Εικόνας 34** παρατηρείται τόσο στα 302 nm όσο και στα 320 nm ο εγγενής φθορισμός της Myc μειώνεται για όλες τις ενώσεις με παρόμοιο τρόπο ενώ η μεγαλύτερη μείωση της έντασης του φθορισμού συναρτίζει της συγκέντρωσης αποδίδεται στην ένωση Myci57.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα διαγράμματα fo-fc/fo – συγκέντρωσης στα 302 nm και στα 320 nm της **Εικόνας 34**, για την ευχερέστερη σύγκριση των καμπυλών τιτλοδότησης με τις διαφορετικές ενώσεις. Και σε αυτή τη περίπτωση οι καμπύλες των ενώσεων στα διαγράμματα τόσο στα 302 nm όσο και στα 320 nm φαίνεται να ακολουθούν κοινή συμπεριφορά. Σύμφωνα, με τα παραπάνω παρότι οι αποκλίσεις στην απόσβεση της έντασης φθορισμού μεταξύ των ενώσεων είναι μικρές μπορούμε να συμπεράνουμε πως η σχετική μείωση της απόσβεσης φθορισμού τόσο στα 302 όσο και στα 320 nm, η οποία έχει άμεση σχέση με την ισχύ αλληλεπίδρασης της Myc με τον αντίστοιχο προσδέτη, είναι μεγαλύτερη για την ένωση Myci57. Επιπλέον, όπως φαίνεται στα διαγράμματα της **Εικόνας 34** όλες οι ενώσεις μειώνουν την ένταση φθορισμού εντονότερα σε σχέση με τον F4 γεγονός που υποδεικνύει αυξημένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη Myc.

Συνοπτικά:

1. Όλες οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν φαίνεται με βάση τα πειράματα φθορισμού και MST να προσδένονται στην πρωτεΐνη Myc, όπως είχαν σχεδιαστεί.
2. Κάποιες από αυτές φαίνεται να διαταράσσουν το σχηματισμό του ετεροδιμερούς Myc/Max, άλλες όχι ή πολύ οριακά.
3. Μερικές ενώσεις φαίνεται επίσης να αποσταθεροποιούν και το ομοδιμερές Max/Max.

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτουν νέα ερωτήματα και υποθέσεις εργασίας που πρέπει να διερευνηθούν μελλοντικά, όπως η πιθανότητα οι ενώσεις που σχεδιάστηκαν με ένωση-οδηγό το Amy22 να συνδέονται σε τμήματα της πρωτεΐνης διαφορετικά από την περιοχή ετεροδιμερισμού Myc/Max και εκείνες που σχεδιάστηκαν με πρότυπο το Myci19 να προσδένονται επίσης στην πρωτεΐνη Max.

### Βιβλιογραφία

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PMID: 21376230.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024 Apr 4. doi: 10.3322/caac.21834. Epub ahead of print. PMID: 38572751.
3. Fabbro D. 25 years of small molecular weight kinase inhibitors: potentials and limitations. *Mol Pharmacol*. 2015 May;87(5):766-75. doi: 10.1124/mol.114.095489. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25549667.
4. Trivedi, R., & Nagarajaram, H. A. (2022). Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. *International journal of molecular sciences*, 23(22), 14050. <https://doi.org/10.3390/ijms232214050>
5. Alshehri, M. A., Manee, M. M., Al-Fageeh, M. B., & Al-Shomrani, B. M. (2020). Genomic Analysis of Intrinsically Disordered Proteins in the Genus *Camelus*. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4010. <https://doi.org/10.3390/ijms21114010>
6. Carabet LA, Rennie PS, Cherkasov A. Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 29;20(1):120. doi: 10.3390/ijms20010120. PMID: 30597997; PMCID: PMC6337544.
7. Ahmadi SE, Rahimi S, Zarandi B, Chegeni R, Safa M. MYC: a multipurpose oncogene with prognostic and therapeutic implications in blood malignancies. *J Hematol Oncol*. 2021 Aug 9;14(1):121. doi: 10.1186/s13045-021-01111-4. Erratum in: *J Hematol Oncol*. 2021 Sep 3;14(1):135. PMID: 34372899; PMCID: PMC8351444.
8. Devaiah BN, Mu J, Akman B, Uppal S, Weissman JD, Cheng D, Baranello L, Nie Z, Levens D, Singer DS. MYC protein stability is negatively regulated by BRD4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jun 16;117(24):13457-13467. doi: 10.1073/pnas.1919507117. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32482868; PMCID: PMC7306749.
9. Devaiah BN, Case-Borden C, Gegonne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, Dey A, Ozato K, Singer DS. BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Jun;23(6):540-8. doi: 10.1038/nsmb.3228. Epub 2016 May 9. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Feb 6;24(2):194. PMID: 27159561; PMCID: PMC4899182.
10. Devaiah BN, Lewis BA, Cherman N, Hewitt MC, Albrecht BK, Robey PG, Ozato K, Sims RJ 3rd, Singer DS. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 1;109(18):6927-32. doi: 10.1073/pnas.1120422109. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22509028; PMCID: PMC3345009.
11. Kotekar A, Singh AK, Devaiah BN. BRD4 and MYC: power couple in transcription and disease. *FEBS J*. 2022 Jul 22. doi: 10.1111/febs.16580. Epub ahead of print. PMID: 35866356.
12. Boi D, Rubini E, Breccia S, Guarguaglini G, Paiardini A. When Just One Phosphate Is One Too Many: The Multifaceted Interplay between Myc and Kinases. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 1;24(5):4746. doi: PMID: 36902175; PMCID: PMC10003727.
13. Campaner E, Rustighi A, Zannini A, Cristiani A, Piazza S, Ciani Y, Kalid O, Golan G, Baloglu E, Shacham S, Valsasina B, Cucchi U, Pippione AC, Lolli ML, Giabbai B, Storici P, Carloni P, Rossetti G, Benvenuti F, Bello E, D'Incalci M, Cappuzzello E, Rosato A, Del Sal G. A covalent PIN1 inhibitor selectively targets cancer cells by a

- dual mechanism of action. *Nat Commun.* 2017 Jun 9;8:15772. doi: 10.1038/ncomms15772. PMID: 28598431; PMCID: PMC5472749.
14. Sears RC. The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle.* 2004 Sep;3(9):1133-7. Epub 2004 Sep 5. PMID: 15467447.
  15. Cohn GM, Liefwalker DF, Langer EM, Sears RC. PIN1 Provides Dynamic Control of MYC in Response to Extrinsic Signals. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Apr 2;8:224. doi: 10.3389/fcell.2020.00224. PMID: 32300594; PMCID: PMC7142217
  16. Farrell AS, Pelz C, Wang X, Daniel CJ, Wang Z, Su Y, Janghorban M, Zhang X, Morgan C, Impey S, Sears RC. Pin1 regulates the dynamics of c-Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis. *Mol Cell Biol.* 2013 Aug;33(15):2930-49. doi: 10.1128/MCB.01455-12. Epub 2013 May 28. PMID: 23716601; PMCID: PMC3719674.
  17. Helander S, Montecchio M, Pilstål R, Su Y, Kuruvilla J, Elvén M, Ziauddin JME, Anandapadamanaban M, Cristobal S, Lundström P, Sears RC, Wallner B, Sunnerhagen M. Pre-Anchoring of Pin1 to Unphosphorylated c-Myc in a Fuzzy Complex Regulates c-Myc Activity. *Structure.* 2015 Dec 1;23(12):2267-2279. doi: 10.1016/j.str.2015.10.010. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26655473; PMCID: PMC4807222
  18. Hydbring P, Castell A, Larsson LG. MYC Modulation around the CDK2/p27/SKP2 Axis. *Genes (Basel).* 2017 Jun 30;8(7):174. doi: 10.3390/genes8070174. PMID: 28665315; PMCID: PMC5541307.
  19. Farrell AS, Sears RC. MYC degradation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Mar 1;4(3):a014365. doi: 10.1101/cshperspect.a014365. PMID: 24591536; PMCID: PMC3935390.
  20. Wang G, Chan CH, Gao Y, Lin HK. Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis. *Chin J Cancer.* 2012 Apr;31(4):169-77. doi: 10.5732/cjc.011.10319. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22200179; PMCID: PMC3777478.
  21. McMahan SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell.* 1998 Aug 7;94(3):363-74. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81479-8. PMID: 9708738.
  22. Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jan 1;4(1):a014357. doi: 10.1101/cshperspect.a014357. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Apr;4(4). doi:10.1101/cshperspect.a023325. PMID: 24384812; PMCID: PMC3869278.
  23. Kurland JF, Tansey WP. Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer Res.* 2008 May 15;68(10):3624-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6552. PMID: 18483244.
  24. Rajabi HN, Baluchamy S, Kolli S, Nag A, Srinivas R, Raychaudhuri P, Thimmapaya B. Effects of depletion of CREB-binding protein on c-Myc regulation and cell cycle G1-S transition. *J Biol Chem.* 2005 Jan 7;280(1):361-74. doi: 10.1074/jbc.M408633200. Epub 2004 Nov 2. PMID: 15522869.
  25. Thomas LR, Wang Q, Grieb BC, Phan J, Foshage AM, Sun Q, Olejniczak ET, Clark T, Dey S, Lorey S, Alicie B, Howard GC, Cawthon B, Ess KC, Eischen CM, Zhao Z, Fesik SW, Tansey WP. Interaction with WDR5 promotes target gene recognition and tumorigenesis by MYC. *Mol Cell.* 2015 May 7;58(3):440-52. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.028. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25818646; PMCID: PMC4427524.

26. Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(23):10220-34. doi: 10.1128/MCB.25.23.10220-10234.2005. PMID: 16287840; PMCID: PMC1291249.
27. Zhang, Q., Spears, E., Boone, D. N., Li, Z., Gregory, M. A., & Hann, S. R. (2013). Domain-specific c-Myc ubiquitylation controls c-Myc transcriptional and apoptotic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 978–983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208334110>
28. Prochownik EV, Wang H. Normal and Neoplastic Growth Suppression by the Extended Myc Network. *Cells.* 2022 Feb 21;11(4):747. doi: 10.3390/cells11040747. PMID: 35203395; PMCID: PMC8870482.
29. Sammak, S., Hamdani, N., Gorrec, F., Allen, M. D., Freund, S. M. V., Bycroft, M., & Zinzalla, G. (2019). Crystal Structures and Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Apo Form of the c-MYC:MAX bHLHZip Complex Reveal a Helical Basic Region in the Absence of DNA. *Biochemistry*, 58(29), 3144–3154. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00296>
30. Beaulieu ME, Castillo F, Soucek L. Structural and Biophysical Insights into the Function of the Intrinsically Disordered Myc Oncoprotein. *Cells.* 2020 Apr 22;9(4):1038. doi: 10.3390/cells9041038. PMID: 32331235; PMCID: PMC7226237.
31. Yagi K, Furuhashi M, Aoki H, Goto D, Kuwano H, Sugamura K, Miyazono K, Kato M. c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):854-61. doi: 10.1074/jbc.M104170200. Epub 2001 Oct 31. PMID: 11689553.
32. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science.* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12. doi: 10.1126/science.281.5382.1509. PMID: 9727977.
33. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer.* 2008 Dec;8(12):976-90. doi: 10.1038/nrc2231. PMID: 19029958.
34. Paglia S, Sollazzo M, Di Giacomo S, Strocchi S, Grifoni D. Exploring MYC relevance to cancer biology from the perspective of cell competition. *Semin Cancer Biol.* 2020 Jun;63:49-59. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.05.009. Epub 2019 May 15. PMID: 31102666.
35. Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022 Jan;19(1):23-36. doi: 10.1038/s41571-021-00549-2. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34508258; PMCID: PMC9083341.
36. Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S. C., Pear, W. S., & Aster, J. C. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes & development*, 20(15), 2096–2109. <https://doi.org/10.1101/gad.1450406>
37. Karadkhelkar NM, Lin M, Eubanks LM, Janda KD. Demystifying the Druggability of the MYC Family of Oncogenes. *J Am Chem Soc.* 2023 Feb 15;145(6):3259-3269. doi: 10.1021/jacs.2c12732. Epub 2023 Feb 3. PMID: 36734615; PMCID: PMC10182829.
38. Chaudhuri R, Bhattacharya S, Dash J, Bhattacharya S. Recent Update on Targeting c-MYC G-Quadruplexes by Small Molecules for Anticancer Therapeutics. *J Med Chem.* 2021 Jan 14;64(1):42-70. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01145. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33355454.
39. Spriano F, Stathis A, Bertoni F. Targeting BET bromodomain proteins in cancer: The example of lymphomas. *Pharmacol Ther.* 2020 Nov;215:107631. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107631. Epub 2020 Jul 18. PMID: 32693114.

40. Rodrik-Outmezguine, V., Okaniwa, M., Yao, Z. *et al.* Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature* **534**, 272–276 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature17963>
41. Graham, L., Banda, K., Torres, A., Carver, B. S., Chen, Y., Pisano, K., Shelkey, G., Curley, T., Scher, H. I., Lotan, T. L., Hsieh, A. C., & Rathkopf, D. E. (2018). A phase II study of the dual mTOR inhibitor MLN0128 in patients with metastatic castration resistant prostate cancer. *Investigational new drugs*, *36*(3), 458–467. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0578-9>
42. Wall M, Poortinga G, Hannan KM, Pearson RB, Hannan RD, McArthur GA. Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood*. 2008 Sep 15;112(6):2305-17. doi: 10.1182/blood-2007-09-111856. Epub 2008 Jul 11. PMID: 18621930.
43. Wiegering, A., Uthe, F. W., Jamieson, T., Ruoss, Y., Hüttenrauch, M., Küspert, M., Pfann, C., Nixon, C., Herold, S., Walz, S., Taranets, L., Germer, C. T., Rosenwald, A., Sansom, O. J., & Eilers, M. (2015). Targeting Translation Initiation Bypasses Signaling Crosstalk Mechanisms That Maintain High MYC Levels in Colorectal Cancer. *Cancer discovery*, *5*(7), 768–781. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1040>
44. Thompson PA, Eam B, Young NP, Fish S, Chen J, Barrera M, Howard H, Sung E, Parra A, Staunton J, Chiang GG, Gerson-Gurwitz A, Wegerski CJ, Nevarez A, Clarine J, Sperry S, Xiang A, Nilewski C, Packard GK, Michels T, Tran C, Sprengeler PA, Ernst JT, Reich SH, Webster KR. Targeting Oncogene mRNA Translation in B-Cell Malignancies with eFT226, a Potent and Selective Inhibitor of eIF4A. *Mol Cancer Ther*. 2021 Jan;20(1):26-36. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0973. Epub 2020 Oct 9. PMID: 33037136.
45. Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6579-88. doi: 10.1038/sj.onc.1206812. PMID: 14528283.
46. Stephens AC. Technology evaluation: AVI-4126, AVI BioPharma. *Curr Opin Mol Ther*. 2004 Oct;6(5):551-8. PMID: 15537057.
47. Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*. 2017 Jun;13(2):48-57. PMID: 28824341; PMCID: PMC5542916.
48. Whitfield, J. R., Beaulieu, M. E., & Soucek, L. (2017). Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability. *Frontiers in cell and developmental biology*, *5*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>
49. Mo, H., & Henriksson, M. (2006). Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(16), 6344–6349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601418103>
50. Jeong KC, Ahn KO, Yang CH. Small-molecule inhibitors of c-Myc transcriptional factor suppress proliferation and induce apoptosis of promyelocytic leukemia cell via cell cycle arrest. *Mol Biosyst*. 2010 Aug;6(8):1503-9. doi: 10.1039/c002534h. Epub 2010 May 18. PMID: 20485733.
51. Jeong KC, Ahn KO, Yang CH. Small-molecule inhibitors of c-Myc transcriptional factor suppress proliferation and induce apoptosis of promyelocytic leukemia cell via cell cycle arrest. *Mol Biosyst*. 2010 Aug;6(8):1503-9. doi: 10.1039/c002534h. Epub 2010 May 18. PMID: 20485733.
52. Seo, H. K., Ahn, K. O., Jung, N. R., Shin, J. S., Park, W. S., Lee, K. H., Lee, S. J., & Jeong, K. C. (2014). Antitumor activity of the c-Myc inhibitor KSI-3716 in gemcitabine-resistant bladder cancer. *Oncotarget*, *5*(2), 326–337. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1545>

53. Berg T, Cohen SB, Desharnais J, Sonderegger C, Maslyar DJ, Goldberg J, Boger DL, Vogt PK. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3830-5. doi: 10.1073/pnas.062036999. Epub 2002 Mar 12. PMID: 11891322; PMCID: PMC122609.
54. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene*. 2003 Sep 18;22(40):6151-9. doi: 10.1038/sj.onc.1206641. PMID: 13679853.
55. Fletcher S, Prochownik EV. Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2015 May;1849(5):525-43. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.005. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24657798; PMCID: PMC4169356.
56. Wang H, Chauhan J, Hu A, Pendleton K, Yap JL, Sabato PE, Jones JW, Perri M, Yu J, Cione E, Kane MA, Fletcher S, Prochownik EV. Disruption of Myc-Max heterodimerization with improved cell-penetrating analogs of the small molecule 10074-G5. *Oncotarget*. 2013 Jun;4(6):936-47. doi: 10.18632/oncotarget.1108. Erratum in: *Oncotarget*. 2018 Oct 12;9(80):35196. PMID: 23801058; PMCID: PMC3757250.
57. Chauhan, J., Wang, H., Yap, J. L., Sabato, P. E., Hu, A., Prochownik, E. V., & Fletcher, S. (2014). Discovery of methyl 4'-methyl-5-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylate, an improved small-molecule inhibitor of c-Myc-max dimerization. *ChemMedChem*, 9(10), 2274–2285. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402189>
58. Shukla S, Fletcher S, Chauhan J, Chalfant V, Riveros C, Mackeyev Y, Singh PK, Krishnan S, Osumi T, Balaji KC. 3JC48-3 (methyl 4'-methyl-5-(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylate): a novel MYC/MAX dimerization inhibitor reduces prostate cancer growth. *Cancer Gene Ther*. 2022 Nov;29(11):1550-1557. doi: 10.1038/s41417-022-00455-4. Epub 2022 Apr 19. PMID: 35440696.
59. Kiessling A, Wiesinger R, Sperl B, Berg T. Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization by a pyrazolo[1,5-a]pyrimidine. *ChemMedChem*. 2007 May;2(5):627-30. doi: 10.1002/cmdc.200600294. PMID: 17315254.
60. Stellas D, Szabolcs M, Koul S, Li Z, Polyzos A, Anagnostopoulos C, Cournia Z, Tamvakopoulos C, Klinakis A, Efstratiadis A. Therapeutic effects of an anti-Myc drug on mouse pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Oct 11;106(12):dju320. doi: 10.1093/jnci/dju320. PMID: 25306215.
61. Hart JR, Garner AL, Yu J, Ito Y, Sun M, Ueno L, Rhee JK, Baksh MM, Stefan E, Hartl M, Bister K, Vogt PK, Janda KD. Inhibitor of MYC identified in a Kröhnke pyridine library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 26;111(34):12556-61. doi: 10.1073/pnas.1319488111. Epub 2014 Aug 11. PMID: 25114221; PMCID: PMC4151726.
62. Castell A, Yan Q, Fawcner K, Hydbring P, Zhang F, Verschut V, Franco M, Zakaria SM, Bazzar W, Goodwin J, Zinzalla G, Larsson LG. A selective high affinity MYC-binding compound inhibits MYC:MAX interaction and MYC-dependent tumor cell proliferation. *Sci Rep*. 2018 Jul 3;8(1):10064. doi: 10.1038/s41598-018-28107-4. PMID: 29968736; PMCID: PMC6030159.
63. Castell A, Yan Q, Fawcner K, Bazzar W, Zhang F, Wickström M, Alzrigat M, Franco M, Krona C, Cameron DP, Dyberg C, Olsen TK, Verschut V, Schmidt L, Lim SY, Mahmoud L, Hydbring P, Lehmann S, Baranello L, Nelander S, Johnsen JI, Larsson LG. MYCMI-7: A Small MYC-Binding Compound that Inhibits MYC: MAX Interaction and Tumor Growth in a MYC-Dependent Manner. *Cancer Res Commun*. 2022 Mar 31;2(3):182-201. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-21-0019. PMID: 36874405; PMCID: PMC9980915.



64. Han H, Jain AD, Truica MI, Izquierdo-Ferrer J, Anker JF, Lysy B, Sagar V, Luan Y, Chalmers ZR, Unno K, Mok H, Vatapalli R, Yoo YA, Rodriguez Y, Kandela I, Parker JB, Chakravarti D, Mishra RK, Schiltz GE, Abdulkadir SA. Small-Molecule MYC Inhibitors Suppress Tumor Growth and Enhance Immunotherapy. *Cancer Cell*. 2019 Nov 11;36(5):483-497.e15. doi: 10.1016/j.ccell.2019.10.001. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31679823; PMCID: PMC6939458.
65. Nicholas B. Struntz, Andrew Chen, Anja Deutzmann, Robert M. Wilson, Eric Stefan, Helen L. Evans, Maricela A. Ramirez, Tong Liang, Francisco Caballero, Mattheus H.E. Wildschut, Dylan V. Neel, David B. Freeman, Marius S. Pop, Marie McConkey, Sandrine Muller, Brice H. Curtin, Hanna Tseng, Kristen R. Frombach, Vincent L. Butty, Stuart S. Levine, Clementine Feau, Sarah Elmiligy, Jiyoung A. Hong, Timothy A. Lewis, Amedeo Vetere, Paul A. Clemons, Scott E. Malstrom, Benjamin L. Ebert, Charles Y. Lin, Dean W. Felsher, Angela N. Koehler, Stabilization of the Max Homodimer with a Small Molecule Attenuates Myc-Driven Transcription, *Cell Chemical Biology*, Volume 26, Issue 5, 2019, Pages 711-723.e14, ISSN 2451-9456, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.02.009>.
66. Soucek L, Helmer-Citterich M, Sacco A, Jucker R, Cesareni G, Nasi S. Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes. *Oncogene*. 1998 Nov 12;17(19):2463-72. doi: 10.1038/sj.onc.1202199. PMID: 9824157.
67. Ellenbroek BD, Kahler JP, Evers SR, Pomplun SJ. Synthetic Peptides: Promising Modalities for the Targeting of Disease-Related Nucleic Acids. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2024 Mar 8:e202401704. doi: 10.1002/anie.202401704. Epub ahead of print. PMID: 38456368.
68. Beaulieu ME, Jauset T, Massó-Vallés D, Martínez-Martín S, Rahl P, Maltais L, Zacarias-Fluck MF, Casacuberta-Serra S, Serrano Del Pozo E, Fiore C, Foradada L, Cano VC, Sánchez-Hervás M, Guenther M, Romero Sanz E, Oteo M, Tremblay C, Martín G, Letourneau D, Montagne M, Morcillo Alonso MÁ, Whitfield JR, Lavigne P, Soucek L. Intrinsic cell-penetrating activity propels Omomyc from proof of concept to viable anti-MYC therapy. *Sci Transl Med*. 2019 Mar 20;11(484):ear5012. doi: 10.1126/scitranslmed.aar5012. PMID: 30894502; PMCID: PMC6522349.
69. Wang E, Sorolla A, Cunningham PT, Bogdawa HM, Beck S, Golden E, Dewhurst RE, Florez L, Cruickshank MN, Hoffmann K, Hopkins RM, Kim J, Woo AJ, Watt PM, Blancafort P. Tumor penetrating peptides inhibiting MYC as a potent targeted therapeutic strategy for triple-negative breast cancers. *Oncogene*. 2019 Jan;38(1):140-150. doi: 10.1038/s41388-018-0421-y. Epub 2018 Aug 3. PMID: 30076412; PMCID: PMC6318000.
70. Garralda E, Beaulieu ME, Moreno V, Casacuberta-Serra S, Martínez-Martín S, Foradada L, Alonso G, Massó-Vallés D, López-Estévez S, Jauset T, Corral de la Fuente E, Doger B, Hernández T, Perez-Lopez R, Arqués O, Castillo Cano V, Morales J, Whitfield JR, Niewel M, Soucek L, Calvo E. MYC targeting by OMO-103 in solid tumors: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2024 Mar;30(3):762-771. doi: 10.1038/s41591-024-02805-1. Epub 2024 Feb 6. PMID: 38321218; PMCID: PMC10957469.
71. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Kluwer Academic Publishing / Plenum Press, 1999.
72. Moran Jerabek-Willemsen, Timon André, Randy Wanner, Heide Marie Roth, Stefan Duhr, Philipp Baaske, Dennis Breitsprecher, MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1077, 2014, Pages 101-113, ISSN 0022-2860, <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>.
73. Pignataro MF, Herrera MG, Dodero VI. Evaluation of Peptide/Protein Self-Assembly and Aggregation by Spectroscopic Methods. *Molecules*. 2020 Oct 21;25(20):4854. doi: 10.3390/molecules25204854. PMID: 33096797; PMCID: PMC7587993.

74. Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016 Jul-Sep;53(3):441-442. doi: 10.4103/0019-509X.200658. PMID: 28244479.
75. Winter, G. E., Buckley, D. L., Paulk, J., Roberts, J. M., Souza, A., Dhe-Paganon, S., & Bradner, J. E. (2015). DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6241), 1376–1381. <https://doi.org/10.1126/science.aab1433>
76. Pogenberg, Vivian & Ogmundsdottir, Margret & Bergsteinsdottir, Kristin & Schepsky, Alexander & Phung, Bengt & Deineko, Viktor & Milewski, Morlin & Steingrímsson, Eiríkur & Wilmanns, Matthias. (2012). Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes & development*. 26. 2647-58. 10.1101/gad.198192.112.